

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**EFEECTO DEL BUTIRATO SOBRE CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO.
OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS
RESISTENTES A BUTIRATO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isabel López de Silanes Asenjo

Bajo la dirección de las doctoras

M^a Antonia Lizarbe Iracheta
Nieves Olmo López

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1832-9

La presente investigación se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, bajo la dirección de la Dra. M^a Antonia Lizarbe Iracheta y la Dra. Nieves Olmo López. A ellas quiero agradecerles los conocimientos y orientaciones recibidos durante estos años, así como su dedicación. También, doy las gracias al Dr. José G. Gavilanes Franco por haberme brindado la oportunidad de incorporarme a este Departamento y por haber sido uno de mis mejores profesores.

Quisiera también dar las gracias a todos aquellos que habéis estado más cercanos durante todos estos años. Al Dr. Javier Turnay, por haber podido contar contigo en todo momento. A Tere, por haber estado muy cerca en los comienzos de mi andadura científica. A Pablo, Ana y Marta, por vuestra ayuda. Y como no, al Dr. José Miguel Mancheño, que posibilitó mi incorporación a este laboratorio.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. González de Buitrago y al Dr. Santarén sus aportaciones a este trabajo de investigación. Al personal del Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal y del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense, mi agradecimiento por los medios prestados para la elaboración e interpretación de los estudios realizados.

*A mi familia,
en especial a mi madre*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CARCINOGENÉISIS COLORRECTAL	4
1.1.1 Estructura del epitelio colónico	5
1.1.2 Etapas de la progresión del carcinoma de colon	7
1.2 INFLUENCIA DE LA DIETA EN EL CÁNCER DE COLON	13
1.3 EL BUTIRATO	16
1.3.1 Obtención, absorción y metabolismo del butirato	16
1.3.2 Efectos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	17
<i>Mecanismo de acción</i>	18
1.3.3 El butirato como agente antitumoral	21
1.4 APOPTOSIS	22
1.4.1 Caspasas	23
<i>Clasificación, estructura y activación</i>	23
<i>Rutas de señalización</i>	24
<i>Ejecución del programa de apoptosis</i>	26
<i>Regulación del procesamiento y de la actividad de caspasas</i>	26
1.4.2 Familia de proteínas de Bcl-2	28
1.4.3 Apoptosis y cáncer	28
1.5 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	29
1.5.1 Clasificación, función, estructura y regulación de las proteínas de choque térmico	29
1.5.2 Proteínas de choque térmico y cáncer	32
1.5.3 Proteínas de choque térmico y apoptosis	33
1.6 TRANSPORTE FACILITADO DE GLUCOSA	34
1.6.1 Transportadores de glucosa y cáncer	36
1.7 METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ	37
1.7.1 Clasificación de las metaloproteinasas de la matriz	38
1.7.2 Estructura de las metaloproteinasas de matriz	38
1.7.3 Regulación de las metaloproteinasas	40
<i>Regulación de la expresión</i>	40
<i>Activación de la proenzima</i>	42
<i>Formación de complejos TIMP-MMP</i>	42
1.7.4 Metaloproteinasas de matriz y progresión tumoral	43

1.8 ANÁLISIS PROTEÓMICOS	44
<i>Electroforesis bidimensional</i>	44
<i>Detección e identificación de manchas</i>	45
<i>Utilidad de los análisis proteómicos</i>	46
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1 LÍNEAS CELULARES	50
3.2 MÉTODOS DE CULTIVO CELULAR	51
3.2.1 Cultivo celular y subcultivos	51
3.2.2 Conservación de los cultivos celulares	52
3.2.3 Tratamiento con butirato	53
3.2.4 Tratamiento con glucosa	53
3.2.5 Obtención y crecimiento de esferoides	53
<i>Estudios de crecimiento y adhesión de los esferoides</i>	54
3.2.6 Estudios de hipertermia y choque térmico	54
<i>Hipertermia</i>	54
<i>Choque térmico</i>	54
3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	54
3.3.1 Microscopía electrónica de transmisión	54
3.3.2 Microscopía electrónica de barrido de superficie	55
3.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS GENERALES	56
3.4.1 Determinación de la concentración de proteína	56
3.4.2 Obtención de extractos celulares	56
3.4.3 Aislamiento de membranas celulares	57
3.5 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS	57
3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	57
<i>Preparación del gel</i>	57
<i>Preparación de las muestras</i>	58
<i>Desarrollo de la electroforesis y detección de proteínas</i>	58
3.5.2 Transferencia e inmunodetección (<i>Western blot</i>)	58
<i>Densitometrado y cuantificación</i>	59
3.5.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	59
3.5.4 Electroforesis bidimensional	61

3.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	62
3.6.1 Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina	62
3.6.2 Determinación de la actividad de caspasas	62
3.6.3 Determinación de actividad de metaloproteinasas	63
<i>Obtención de medios condicionados</i>	63
<i>Gelatinograma</i>	63
<i>Caseinograma</i>	64
3.7 OTRAS TÉCNICAS Y ENSAYOS	64
3.7.1 Ensayo de viabilidad celular por MTT	64
3.7.2 Citometría de flujo	65
3.7.3 Detección de MMP-11 por RT-PCR	65
<i>Aislamiento del RNA</i>	65
<i>Reacción de RT-PCR</i>	66
<i>Amplificación del cDNA mediante PCR</i>	66
3.7.4 Determinación de la capacidad tumorigénica: estudios <i>in vivo</i>	67
3.7.5 Desglicosilación de membranas celulares	67
 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 68
 4.1 OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS BCS-TC2.BR2	 70
4.1.1 Apoptosis inducida por butirato y actividad mitocondrial	74
4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS BCS-TC2.BR2	80
4.2.1 Estudios de proliferación celular	80
4.2.2 Diferenciación celular	82
<i>Naturaleza epitelial</i>	82
<i>Estudios morfológicos</i>	83
<i>Fosfatasa alcalina</i>	92
4.2.3 Resistencia a apoptosis	95
<i>Efecto de concentraciones mayores de butirato</i>	95
<i>Actividad de caspasa 3</i>	97
<i>Expresión de p21</i>	98
<i>Expresión de Bcl-2 y Bax</i>	100
4.3 REVERSIBILIDAD DE LA RESISTENCIA A BUTIRATO	101
4.4 PROLIFERACIÓN <i>IN VIVO</i> Y FORMACIÓN DE ESFEROIDES	103
4.4.1 Capacidad tumorigénica	103
4.4.2 Expresión de metaloproteinasas de la matriz	105

4.4.3 Formación de esferoides	109
<i>Curvas de proliferación de los esferoides</i>	111
<i>Estudios de diferenciación celular</i>	114
4.5 RESPUESTA AL ESTRÉS METABÓLICO Y AL ESTRÉS TÉRMICO	115
4.5.1 Efecto de la eliminación de la glucosa del medio de cultivo	115
<i>Inducción de apoptosis</i>	115
<i>Actividad de caspasas</i>	118
<i>El butirato como fuente alternativa de energía</i>	119
<i>Transportadores de glucosa</i>	122
4.5.2 Resistencia al estrés térmico	129
<i>Estudios de hipertermia</i>	132
<i>Estudios de choque térmico</i>	137
<i>Efecto del butirato en la expresión de proteínas de choque térmico</i>	139
4.6 ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS CÉLULAS BCS-TC2, BCS-TC2.BR2 Y SUBLÍNEAS TUMORIGÉNICAS	141
 5. CONCLUSIONES	 150
 6. BIBLIOGRAFÍA	 152

ABREVIATURAS

ALP	fosfatasa alcalina
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
BSA	albúmina de suero bovino
CHAPS	(3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano sulfonato
DCFH	diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DCC	<i>deleted in colorectal carcinomas</i>
DEPC	dietil pirocarbonato
DEVD	D:Aspartico; E: glutámico; V: valina
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsufóxido
DNasa	desoxirribonucleasa
DTT	ditiotritol
ECL	<i>enhanced Chemiluminiscence Western blotting</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FCS	suero fetal bovino
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GLUT	<i>glucose transporter</i>
Hepes	ácido 2-(4-(2hidroxietil)-piperanicil-1)-etanosulfónico
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
kDa	kilodalton
LEHD	L: leucina; E: glutamina; H: histidina; D: aspártico
MCC	<i>mutated in colorectal cancer</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MOPS	ácido [3-(N-morfolinopropano)] sulfónico
MSH	<i>mutS homologue (mismatch repair gene)</i>
MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio
NEM	N-etil-maleimida
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino libre de iones calcio y magnesio
PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPO	difeniloxazona
RER ⁺	<i>replication errors</i>
RNasa A	ribonucleasa A
RT-PCR	<i>reverse transcription-polimerase chain reaction</i>
SDS	dodecilsulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilén-diamina
TGF	factor de crecimiento transformante
TIMP	<i>tissue-inhibitor of metalloproteinases</i>
TIU	<i>trypsin inhibitor unit</i>
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

INTRODUCCIÓN

La carcinogénesis, u oncogénesis, es el resultado de un proceso multiseccional caracterizado por la proliferación descontrolada de un grupo de células (denominado tumor), con la subsiguiente adquisición de capacidad invasiva, lo que permite a las células migrar hacia otras localizaciones y colonizar distintos tejidos u órganos distantes (proceso conocido como metástasis) (Figura 1). El primero de los eventos de la carcinogénesis, la proliferación incontrolada de células normales, es una propiedad de todas las neoplasias o tumores. Sin embargo, una neoplasia puede ser benigna o maligna en función de que las células puedan o no adquirir una capacidad invasiva y metastásica. La etiología molecular del cáncer radica en una acumulación sucesiva de alteraciones genéticas originadas como consecuencia de la exposición a agentes carcinogénicos y que puede potenciarse a causa de una susceptibilidad genética inherente al individuo. Las alteraciones genéticas provocan cambios en la expresión de proto-oncogenes y de genes supresores de tumores, lo que conduce a la adquisición de un fenotipo tumorigénico. La función anómala de los productos proteicos de estos genes desencadena una regulación anormal de procesos y de vías de señalización que controlan el ciclo celular, un bloqueo de la apoptosis, alteración de la estabilidad genética, y modificación de la diferenciación celular y reacciones morfogenéticas (revisado en Kopnin, 2000). De este modo, la adquisición de un fenotipo maligno se caracteriza por cambios en la morfología celular, por alteración de los mecanismos normales que regulan la proliferación celular, por modificaciones en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, que facilitan la motilidad celular, y por un incremento en la producción de enzimas proteolíticas y factores angiogénicos. Todo ello, acompañado de una progresiva inhibición de la muerte celular programada o apoptosis, va a determinar la adquisición de la capacidad invasiva y metastásica de las células tumorales.

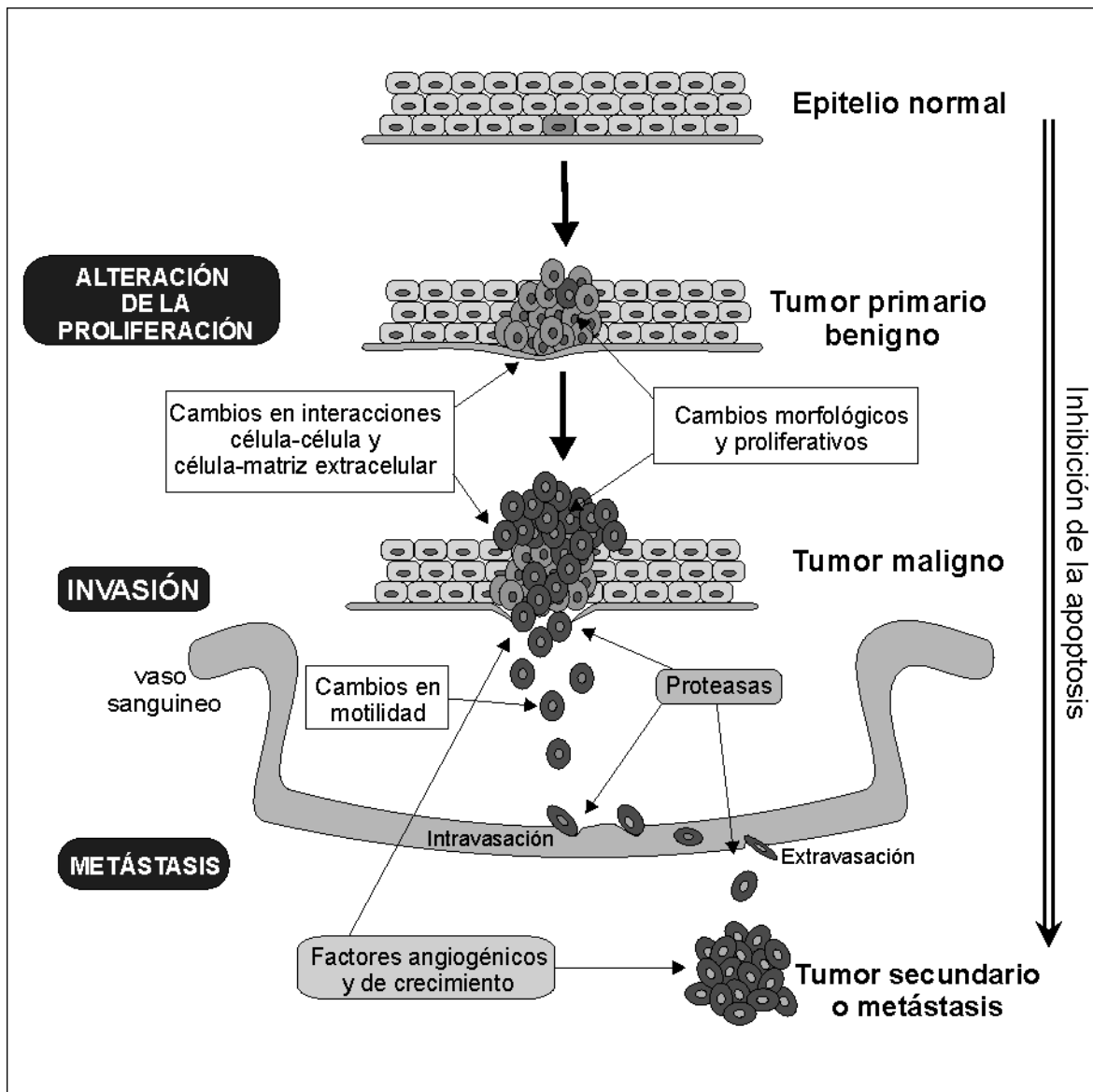


Figura 1.- Principales etapas de la progresión tumoral.

El epitelio está formado por un conjunto de células unidas fuertemente y organizadas en una o varias capas, estando la última de ellas adherida al basamento membranoso. La acumulación de alteraciones genéticas en una célula (coloreada en naranja) produce cambios en la proliferación y en la organización epitelial generándose un tumor primario, que puede ser benigno. Posteriores alteraciones genéticas (célula en rojo) provocan la formación de un tumor maligno constituido por células con mayor capacidad proliferativa e invasiva que, una vez degradada la matriz extracelular circundante, pueden alcanzar la circulación. En el torrente circulatorio, las células malignas deben superar el trauma mecánico del flujo sanguíneo y escapar de los mecanismos de defensa inmunológicos. Solo algunas células (en morado) sobreviven a este proceso y son capaces de adherirse a la pared endotelial de los vasos sanguíneos del órgano diana y completar la extravasación. Para establecer el nuevo foco neoplásico, o metástasis, estas células deben invadir el órgano al que han llegado y adaptarse al nuevo entorno. Pero, no todas las células tumorales que penetran en un órgano sobreviven y proliferan. Además, para la formación de la nueva colonia es imprescindible que se produzca la formación de nuevos vasos (angiogénesis) que asegure la llegada al nuevo foco de los nutrientes necesarios para el crecimiento celular. Estos focos secundarios pueden ser, a su vez, fuente de nuevas metástasis.

1.1 CARCINOGENESIS COLORRECTAL

El cáncer colorrectal es uno de los cánceres más comunes en los países occidentales. En España, 29-30 personas de cada 100.000 padecen esta enfermedad, siendo la segunda causa de muerte por cáncer, después del cáncer de pulmón en el hombre y del cáncer de mama en la mujer. En la tabla I se recogen datos relativos a la incidencia y mortalidad por esta patología durante el año 1998 en las distintas Comunidades Autónomas Españolas.

Tabla I.- Incidencia y mortalidad debida a cáncer colorrectal en España durante 1998.

Comunidad	INCIDENCIA		MORTALIDAD	
	nº de casos	casos/100.000	nº de casos	casos/100.000
Andalucía	1.600	21,90	1.240	1,69
Aragón	317	26,71	287	2,41
Asturias	382	35,23	288	2,65
Baleares	214	26,04	158	1,92
Canarias	237	14,17	212	1,26
Cantabria	160	30,28	113	2,13
Castilla y León	889	35,73	668	2,68
Castilla La Mancha	414	23,98	327	1,89
Cataluña	2.738	44,11	1.498	2,41
Ceuta y Melilla	14*	10,72*	25	1,91
Comunidad Valenciana	1.248	30,69	860	2,11
Extremadura	227	21,14	250	2,32
Galicia	846	30,99	637	2,33
La Rioja	79	29,79	55	2,07
Madrid	1.255	24,39	989	1,92
Murcia	288	25,46	189	1,67
Navarra	180	33,46	115	2,13
País Vasco	738	35,14	431	2,05
TOTAL	11.826	29,4	8.342	2,07

Fuente: Instituto Nacional de Estadística (* Los datos de incidencia corresponden sólo a Ceuta)

Un gran número de estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que los factores ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de este tipo de cáncer, habiéndose sugerido que son los causantes principales del **cáncer colorrectal esporádico o no familiar**. No obstante, estos factores de riesgo no afectan de igual manera a las personas. De hecho, hasta un 25% de pacientes con cáncer colorrectal pueden tener antecedentes familiares de esta enfermedad, lo que sugiere la existencia de una cierta predisposición genética. En este sentido, está ampliamente descrito que los síndromes hereditarios que afectan al intestino grueso tienen su origen en alteraciones genéticas de las células germinales que pueden degenerar, en último término, en cáncer de colon. Estos **cánceres hereditarios**, que dan cuenta de

aproximadamente el 5% de los cánceres colorrectales, se pueden dividir en dos grupos principales: los síndromes con poliposis, que han sido objeto de muchos estudios pero son poco frecuentes, y los síndromes sin poliposis, más frecuentes y cada vez mejor conocidos. En la tabla II se recogen los principales factores descritos que pueden influir favorable o desfavorablemente, en la generación y desarrollo del cáncer colorrectal.

Tabla II.- Factores que afectan al desarrollo del cáncer colorrectal.

Edad
Dieta
Síndromes hereditarios (herencia autosómica dominante)
Poliposis familiar del colon o poliposis adenomatosa familiar
Síndrome de Gardner
Síndrome de Turcot
Síndrome sin poliposis (Síndrome de Lynch)
Enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, la colitis ulcerosa)
Bacteriemia por <i>Streptococcus bovis</i>
Uretero sigmoidostomía
¿Sexo?
¿Consumo de tabaco?
¿Alcohol?

1.1.1 Estructura del epitelio colónico

El epitelio del colon normal está formado por una única capa de células epiteliales que descansan sobre un basamento membranoso. Esta lámina epitelial se organiza formando invaginaciones tubulares, denominadas criptas, con anchos repliegues entre las mismas a modo de proyecciones que están en contacto directo con el lumen intersticial (Figura 2). La mucosa colónica de un adulto normal contiene aproximadamente 5×10^{10} células epiteliales (Mehl, 1991). En dicho epitelio se pueden distinguir principalmente cuatro tipos celulares distintos: células madre, colonocitos, células caliciformes y células enteroendocrinas. Todas ellas proceden de los mismos progenitores, las células madre. Los colonocitos o células absortivas, que constituyen la mayor parte del epitelio, están implicadas en los procesos de absorción de agua, electrolitos y ácidos grasos de cadena corta. Las células caliciformes se encargan de secretar mucinas, las cuales ejercen una función protectora sobre el epitelio colónico. Además, al otro lado de los basamentos membranosos, se localizan otros tipos celulares como fibroblastos y las poco conocidas células dendríticas del colon, que regulan la inmunidad intestinal (Bell y col., 2001).

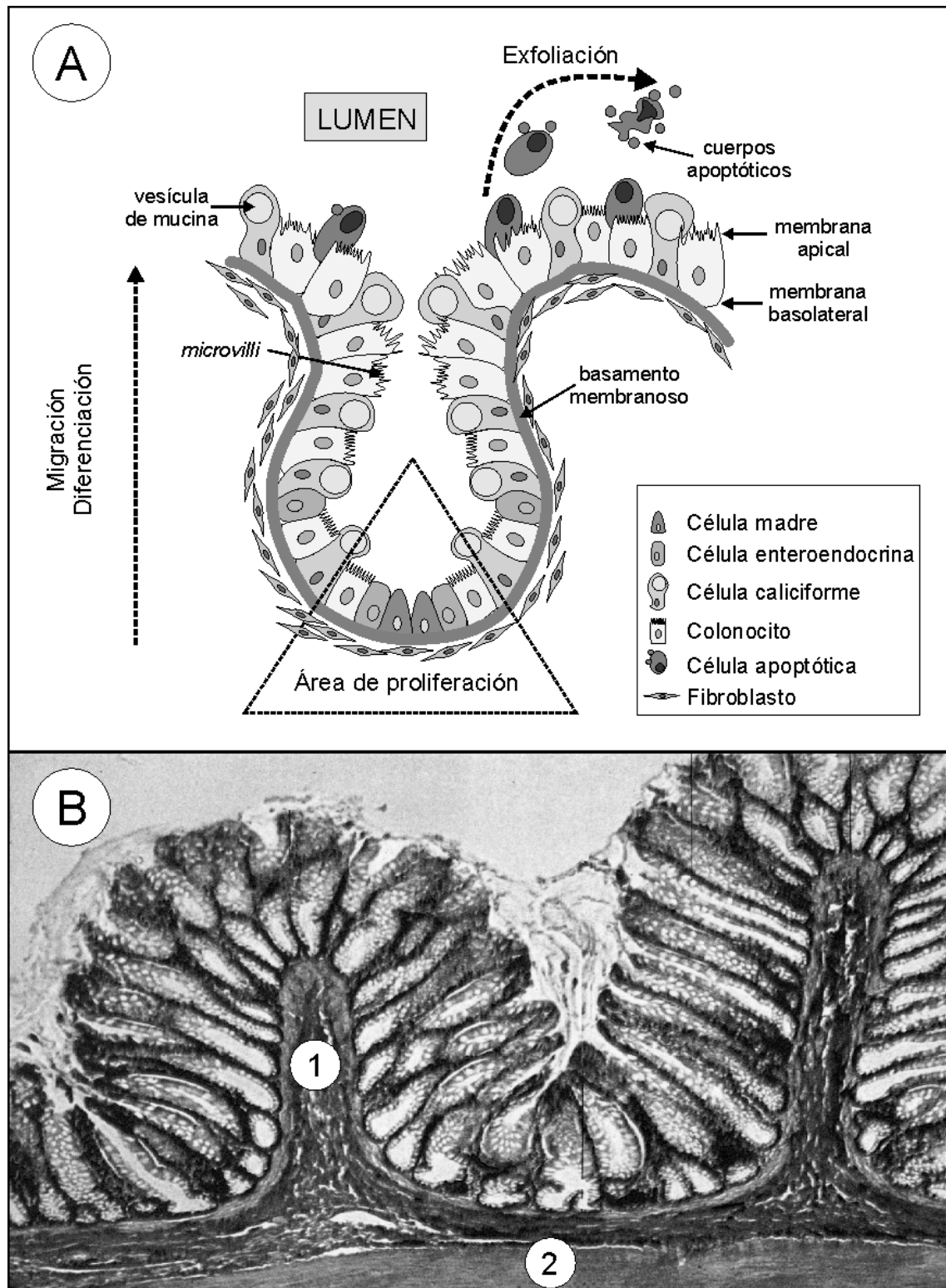


Figura 2.- Estructura de las criptas del intestino grueso.

(A) Las criptas intestinales son invaginaciones de la superficie del epitelio en forma de estructuras tubulares. Las células proliferativas se encuentran en la base de las criptas y, desde allí, se diferencian a medida que migran a lo largo del eje de la cripta perdiendo su capacidad para dividirse. Una vez que alcanzan la superficie expuesta, mueren por apoptosis y se desprenden hacia el lumen intestinal. La zona de proliferación se limita a los dos tercios inferiores de la cripta, siendo especialmente significativa en el tercio inferior. (B) Corte histológico de una sección de los pliegues de la pared del intestino. **1:** capa muscular del pliegue de la pared (*muscularis mucosae*) y estrato de tejido conjuntivo con vasos sanguíneos; **2:** capa muscular externa (*muscularis externa*) [tomada de: Atlas de histología (Krommenhoek y col., 1996)]

Las células madre se encuentran en la base de las criptas y, a partir de ellas, las células se diferencian y se movilizan hasta alcanzar la superficie expuesta. Estas células se dividen sin límite a lo largo de toda la vida de forma asincrónica, es decir, de la progenie, una célula hija mantiene el fenotipo de célula madre mientras que la otra continúa dividiéndose y diferenciándose. Estas últimas migran a lo largo de las criptas de manera que, durante este tránsito, el número de divisiones disminuye progresivamente y se incrementa el grado de diferenciación de las células. En el control del estado de diferenciación celular parecen intervenir factores de crecimiento autocrino junto con determinados productos de la dieta, aunque la naturaleza exacta de los distintos reguladores (positivos o negativos) no está del todo establecida. Finalmente, cuando las células han alcanzado la parte más apical, mueren por apoptosis y se desprenden hacia el lumen intestinal. Por tanto, los procesos de proliferación, diferenciación, apoptosis y eliminación celular se producen secuencialmente en el colon. Se estima que el tiempo requerido para que transcurran estas etapas es de 3-8 días, siendo este valor de recambio uno de los más rápidos de los tejidos del cuerpo humano.

1.1.2 Etapas de la progresión del carcinoma de colon

El cáncer es una enfermedad genética, donde la mayoría de las mutaciones se producen en células somáticas y están provocadas por errores intrínsecos de la replicación del DNA o son provocados por exposición a carcinógenos. Normalmente, no es suficiente que se produzca una única alteración genética para que se origine la transformación neoplásica de una célula. De hecho, el fenotipo maligno sólo se obtiene después de que varias mutaciones (de 5 a 10, y normalmente producidas a lo largo de muchos años) provoquen alteraciones en diversos productos génicos. En este sentido, distintos estudios llevados a cabo con numerosos carcinomas colorrectales, han permitido establecer una secuencia de cambios genéticos concretos correlacionados con etapas específicas de la progresión tumoral. Estas observaciones permitieron a Fearon y Vogelstein (1990) proponer un modelo secuencial de cambios genéticos, que se ha ido completando en los últimos años (Figura 3). En este modelo, la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores juegan un papel importante en las alteraciones del epitelio y en la progresión de adenoma a carcinoma, cambios descritos en el modelo histológico clásico de la tumorigénesis colorrectal. Se han descrito dos vías, la supresora y la mutadora, que afectan a la estabilidad genómica de forma diferente. La vía supresora genera inestabilidad cromosómica (aneuploidía) y mutaciones que activan oncogenes o que inactivan genes supresores; esto se ha observado en el 80% de los cánceres colorrectales esporádicos y en la de poliposis adenomatosa familiar hereditaria. La vía mutadora origina la inestabilidad de microsatélites, o secuencias repetidas, observándose estas alteraciones en el 90% de los de tipo hereditario no polipósico y en un 15% de los esporádicos.

La primera alteración detectada en el epitelio normal en cáncer colorrectal hereditario y en las primeras etapas del esporádico es la pérdida o inactivación del gen supresor de tumores *APC-Adenomatosis Polyposis Coli*, situado en el cromosoma 5q, lo que está asociado con una hiperproliferación anormal del epitelio. El producto del gen *APC* modula la señal oncogénica de Wnt1 a través de sus efectos sobre los niveles citoplasmáticos de la β -catenina. Además, está implicado en procesos de proliferación y control del ciclo celular, migración, diferenciación y apoptosis (revisado en Goss y Groden, 2000; Kaplan y col., 2001). Mutaciones o microdeleciones en este gen constituyen la base genética del síndrome de poliposis adenomatosa familiar. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de cientos de adenomas a lo largo del colon, así como en otras partes del cuerpo, que pueden degenerar en la formación de un tumor maligno. Este síndrome da cuenta del 1% del total de los cánceres colorrectales. Cabe destacar que las alteraciones moleculares detectadas en las formas hereditarias se han descrito también en las formas no familiares o esporádicas de cáncer colorrectal. Así, la inactivación somática de *APC* ocurre en el 50% de los adenomas y en el 80% de los adenocarcinomas de colon esporádicos (Kinzler y Vogelstein, 1996). En la mayoría de los tumores de colon esporádicos se han detectado mutaciones en ambos alelos de *APC*, permaneciendo constante la frecuencia entre tumores malignos y benignos. Estos datos sugieren que la mutación en *APC* juega un papel relevante durante la iniciación de la carcinogénesis colorrectal más que en la progresión de tumor benigno a maligno. Estudios recientes muestran la existencia de mutaciones somáticas en la propia β -catenina durante la carcinogénesis colorrectal (Tetsu y McCormick, 1999; Wagenaar y col., 2001). La inactivación de otro gen supresor de tumores, *MCC (Mutated in Colorectal Cancer)*, también localizado en el cromosoma 5q, parece estar asociada con la hiperproliferación celular de las etapas iniciales. El producto de este gen actúa modulando el ciclo celular inhibiendo la progresión desde la fase G₁ hacia la fase S (Matsumine y col., 1996).

Otros oncogenes, también alterados en el cáncer de colon, son el *K-ras* y el *c-myc*. En un porcentaje elevado de adenomas de gran tamaño aparecen mutaciones en el gen *K-ras* (Minamoto y col., 2000). La proteína que codifica este oncogén actúa como una proteína G y se activa una vez anclada a la membrana celular. Se encarga de transmitir la señal mitogénica generada en la membrana celular (tras la unión de los factores de crecimiento a sus receptores) a elementos responsables de la transcripción de genes implicados en el crecimiento celular o diferenciación. Con respecto al regulador de la transcripción *c-myc*, los niveles de mRNA están elevados en el 60-70% de los adenomas y carcinomas colorrectales (De Benedetti y col., 1994). El oncogén *c-yes*, de la familia de proteínas c-src, está sobreexpresado en tumores colorrectales (Pena y col., 1995). El producto del gen *c-src* es una tirosina quinasa asociada a la membrana que participa en la transmisión de la señal mitogénica. Esta proteína se activa entre cinco y diez veces en el 70% de los cánceres colorrectales (Talamonti y col., 1993).

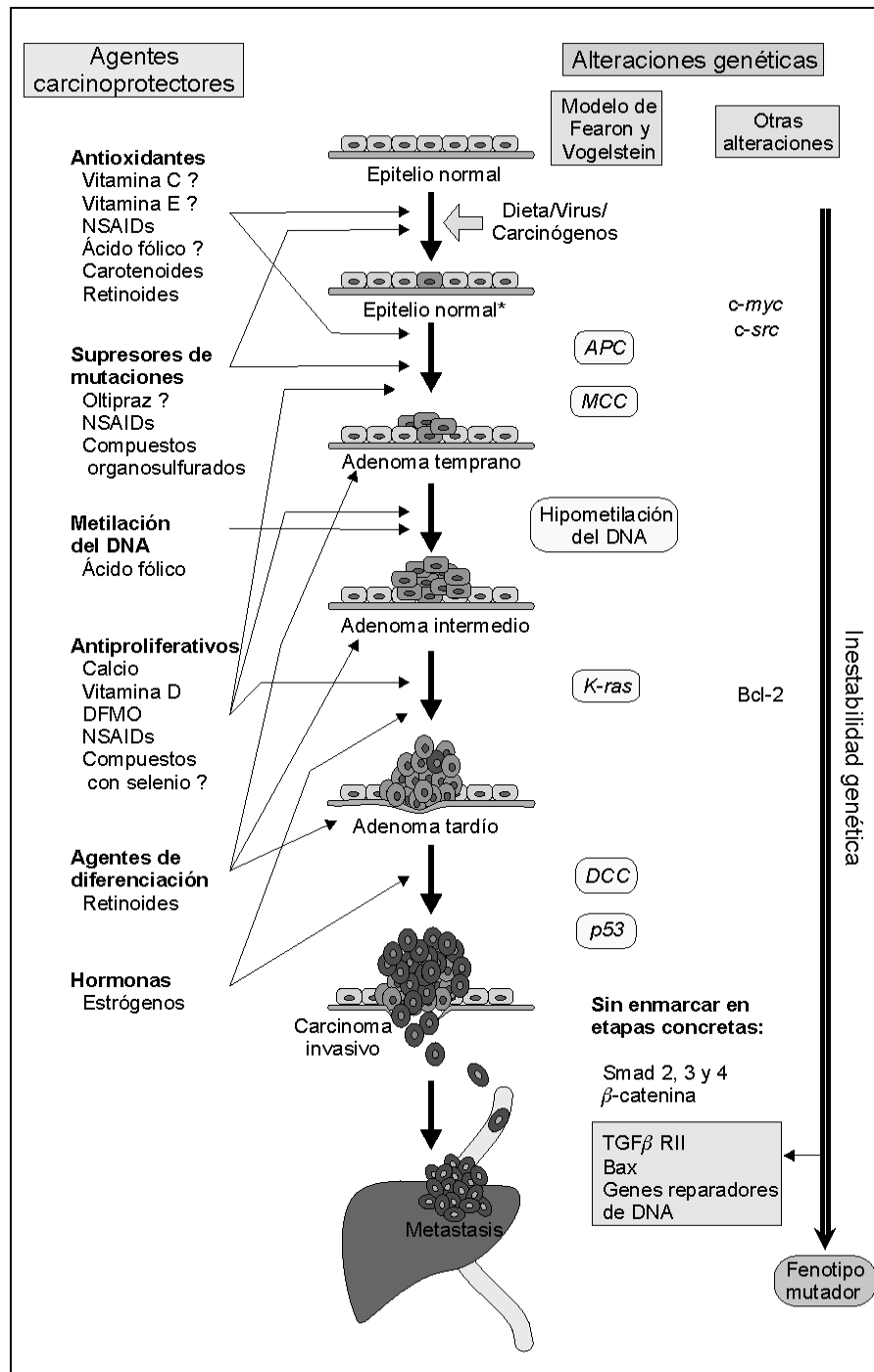


Figura 3.- Etapas de progresión en el desarrollo del adenocarcinoma de colon.

Los carcinógenos de la dieta, otros carcinógenos, los virus, etc. pueden desencadenar la transformación de alguna célula del epitelio del colon. En la parte de la derecha de la figura se recogen distintas alteraciones genéticas (que se describen en el texto), cuya acumulación, no necesariamente de acuerdo a esta secuencia, conducen a la progresión desde el epitelio normal al adenoma y hasta el carcinoma invasivo. En la parte izquierda se recogen algunos de los agentes utilizados, o que se encuentran en vías de estudio, para la prevención de este tipo de tumores, en función de las alteraciones moleculares producidas. NSAIDs: drogas antiinflamatorias no esteroídicas; DFMO: difluorornitimetionina (inhibidor de la ornitina descarboxilasa y supresor de la síntesis de poliaminas); Oltipraz: ditioltionina sintética, análoga de 1,2 ditioltioninas de crucíferas, que induce la producción de enzimas detoxificantes. La interrogación al final de alguno de los agentes carcinoprotectores indica que el mecanismo de su actuación no se conoce bien, o que los estudios se han realizado en modelos animales y no hay datos clínicos.

Durante la carcinogénesis colorrectal también pueden producirse diversas deleciones en distintos cromosomas. Las más frecuentes afectan al brazo corto del cromosoma 18 y al largo del 17, donde se localizan, respectivamente los genes *DCC* y *p53*. El gen *DCC* (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) codifica para una proteína de membrana cuyo dominio extracelular presenta homología con moléculas de adhesión celular, por lo que se ha sugerido su participación en el establecimiento de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Hedrick y col., 1994). Recientemente se ha demostrado que también es capaz de interaccionar con las caspasas 9 y 3, promoviendo la activación de esta última de un modo independiente de factores mitocondriales, lo que sitúa a esta proteína en una nueva vía de inducción de apoptosis (Forcet y col., 2001). El gen supresor de tumores *p53* está mutado en el 75 % de los carcinomas colorrectales. La proteína que codifica juega un papel fundamental como reguladora del ciclo celular ya que es capaz de unirse a secuencias específicas del DNA provocando la parada en G1, lo que permite a la célula reparar el DNA dañado. También está implicado en la inducción del proceso de apoptosis cuando detecta que el DNA no ha sido corregido correctamente (Somasundaran y El-Deiry, 2000). En un estudio reciente se recoge que la proteína p53 regula la expresión del gen *APC*, en cuyo promotor se han descrito dos sitios de unión de p53. Esta regulación es dependiente del estado de fosforilación de la proteína p53 (Jaiswal y Narayan, 2001).

En los últimos años se ha descrito que alteraciones en la vía de señalización a partir de TGF- pueden participar en la progresión de adenoma a carcinoma de colon (Takaku y col., 1998). Normalmente el TGF- desencadena señales de proliferación y/o diferenciación en células epiteliales de colon. Dos tipos de receptores (TGF- RI y TGF- RII) median la señal entre las células y este factor, lo que conduce a un complejo mecanismo de señalización, en el que participan proteínas de la familia Smad. Además, también se han detectado mutaciones en los genes *Smad4* y *Smad2* en carcinomas de colon (Eppert y col., 1996; Kopnin y col., 2000). Por otro lado, el estudio en ratones *knockout* para *Smad4* ha puesto de manifiesto su papel como gen supresor de la progresión de tumores de colon (Takaku y col., 1998).

La secuencia de mutaciones que se propone en el modelo recogido en la figura 3 es el resultado de un análisis estadístico y no implica que en un individuo se den necesariamente en el orden descrito. No obstante, el grupo de Vogelstein (1989) encontró que se produce una pérdida de una media de 4-5 alelos en cada carcinoma colorrectal analizado. Por tanto, parece que es la acumulación de mutaciones, más que el orden en que se producen, la que determina la adquisición del fenotipo maligno. Esta secuencia mutacional puede producirse o acelerarse con la adquisición de lo que se denomina fenotipo mutador (RER⁺), descrito en gran número de tumores y puesto en evidencia en las neoplasias colorrectales, tanto esporádicas como hereditarias de tipo no polipósico (Shibata y col., 1994; Perucho y col., 1996). El fenotipo

mutador surge como resultado de mutaciones en los genes de reparación de errores en el DNA (*hMSH2*, *hMLH1*, *PMS1* y *PMS2*), las cuales provocan nuevas mutaciones y una elevada inestabilidad genética, promoviendo alteraciones en las secuencias microsatélites (Vaurs y Bignon, 1997; Lynch y col., 1997). Los microsatélites están fundamentalmente localizados en regiones no codificantes del genoma; sin embargo, también se han encontrado estas secuencias repetidas en regiones codificantes, lo que ha permitido identificar varios genes que están alterados en los tumores con este fenotipo mutador. Entre estos se encuentra el gen del receptor de tipo II del TGF- β . En 1995 se describió que una secuencia de diez nucleótidos de adenina, contenida en la región codificante de este receptor, está alterada en los tumores colorrectales RER⁺ (Markowitz y col., 1995). Esta mutación provoca una reducción del número de transcritos del receptor y, consecuentemente, la ausencia de la proteína en la superficie celular. Las alteraciones relativas a este receptor se han encontrado específicamente en los tumores de colon RER⁺ y en los tumores gástricos RER⁺ (Myeroff y col., 1995).

El gen *Bax*, miembro de la familia de genes *Bcl-2*, está implicado en la inducción de la apoptosis. Dicho gen contiene, en su región codificante, una secuencia de ocho nucleótidos de guanina que se encuentra mutada (por inserción o delección de 1 pb) en el 50% de los tumores colorrectales RER⁺ y en algunos de los de tipo RER⁻ (Rampino y col., 1997). Las alteraciones encontradas conducen a la disminución, incluso a la ausencia, de la proteína Bax favoreciendo que las células escapen del proceso de apoptosis. En la actualidad se han descrito alteraciones en otras proteínas que participan en el proceso de apoptosis durante el desarrollo y progresión de tumores de colon, aunque su implicación durante el mismo no está del todo establecida (Bronner y col., 1995).

Además de las mutaciones somáticas, que producen alteraciones en la expresión génica, otro de los mecanismos reguladores frecuentemente alterados en el cáncer, y relativamente tempranos en la carcinogénesis colorrectal, son los cambios en la metilación del DNA (Issa, 2000). Con respecto a esta modificación, se ha descrito una hipometilación (Figura 3), producida por la activación de una desmetilasa, que puede causar un incremento en la expresión de oncogenes o mutaciones en diversos genes. En segundo lugar, se ha observado un incremento en varias DNA-metiltransferasas que están implicadas en el control del ciclo celular. Un tercer cambio, que puede producirse a pesar de existir un estado global de hipometilación, es la hipermetilación local o metilación *de novo* de islas CpG (Toyota y col., 1999). En cáncer de colon se ha descrito la metilación de este tipo de secuencias, que están localizadas en los promotores de genes implicados en el control del ciclo celular y en otros múltiples procesos (adhesión, metástasis, angiogénesis, etc.). Algunos ejemplos son los promotores de los genes de la *E-cadherina*, *APC*, *TIMP3*, *p14*, *p16*, *hMLH1*, etc. (Toyota y col., 1999; Esteller y col., 2000). Esta metilación afecta a la expresión génica, pudiendo

producirse la silenciación simultánea de varios genes, traducándose en un efecto similar al de las mutaciones. Así, se ha descrito el fenotipo CIMP (*CpG Island Methylator Phenotype*) que, en algunos casos, solapa con el fenotipo RER. Se ha intentado explicar el mecanismo de silenciación considerando que las metilcitosinas de las secuencias CpG son hipermutables, y la tasa de reparación de estas regiones alteradas es baja. A estas secuencias metiladas se uniría una proteína (MeCp2) que tiene propiedades represivas. Su unión recluta a varias proteínas, entre las que se incluye la histona desacetilasa; estos complejos proteicos alterarían la configuración de la cromatina, bloqueando la unión de factores transcripcionales.

Este tipo de metilaciones también se producen con la edad en la mucosa colónica normal (Ahuja e Issa, 2000). De este modo, con la edad se produciría una predisposición de las células normales a la transformación neoplásica. Un grupo de genes (*receptores de estrógenos, versicano*) se metila con la edad y en cáncer de colon; otros exclusivamente en neoplasmas (*APC, hMLH1, p14, p16*) (Toyota e Issa, 2000).

Los recientes avances en el conocimiento de la biología molecular y de las alteraciones genéticas asociadas al cáncer de colon están facilitando el desarrollo de distintos fármacos que pueden ser capaces de retardar o prevenir la transformación del epitelio colorrectal. Como se muestra en la figura 3, se está intentando asociar la actuación de estos fármacos con etapas específicas de la transformación del epitelio normal a adenoma tardío (Krishnan y col., 2000). Sin embargo, los posibles mecanismos de actuación de estos agentes pueden ser múltiples, y algunos aún son especulativos. Además, estos fármacos se encuentran en fase de experimentación debiéndose determinar la dosis adecuada, el tiempo de tratamiento y los perfiles de toxicidad. En un futuro, el esclarecimiento de las bases moleculares de la carcinogénesis colorrectal y de los mecanismos de actuación de estos fármacos puede contribuir a reducir la incidencia de este tipo de cáncer.

Entre todos esos agentes, han recibido una atención especial las drogas antiinflamatorias no esteroídicas (NSAIDs; entre ellas la aspirina). En modelos animales se ha observado que estos compuestos son capaces de inhibir la carcinogénesis cuando en los tumores de colon se detectan concentraciones elevadas de prostaglandinas (por ejemplo, PGE₂). La supresión de la carcinogénesis la realizan por modulación del crecimiento celular, neutralización de carcinógenos tisulares, generación de leucotrienos protectores, e inducción de la apoptosis (Stark y col. 2001).

Los eicosanoides regulan un amplio número de funciones fisiológicas del epitelio gastrointestinal, entre las que se incluyen el control homeostático, el del flujo sanguíneo en la mucosa y el de la proliferación celular. En la biosíntesis de eicosanoides están implicadas dos

isoenzimas con actividad ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). La COX-1 se expresa en casi todos los tejidos y es responsable de la producción de las prostaglandinas requeridas para el mantenimiento de la integridad de la mucosa colónica. Sin embargo, la COX-2, no expresada en el epitelio normal, es una enzima inducible por factores de crecimiento, mitógenos y estímulos inflamatorios, y puede generar resistencia a la apoptosis (Gupta y DuBois, 2000). Los niveles elevados de prostanoïdes en tumores colorrectales, que parecen estar relacionados con un incremento en la proliferación celular, se han asociado con la inducción de la COX-2. Los NSAIDs, entre los que ya se han descrito inhibidores específicos de la COX-2, suprimen la producción de prostaglandinas ya que inactivan irreversiblemente a la ciclooxigenasa por acetilación de un residuo de serina (Chen y col., 2001).

En el grupo de micronutrientes cabe destacar al ácido fólico. La eliminación o disminución del folato de la dieta parece estar relacionada con un incremento en la carcinogénesis, mientras que una dieta rica en folato ejerce un efecto protector. Aunque los mecanismos de esta modulación no se conocen, se han asociado con el papel que desempeña el folato en la formación de S-adenosilmetionina, el donador universal de grupos metilo, y a su implicación en la biosíntesis de purinas y de timina requeridas para la síntesis de ácidos nucleicos (Choi y Mason, 2000). Además, se le ha asignado un papel en los mecanismos de metilación del DNA; la hipometilación de *loci* específicos en el DNA (por ejemplo, en la región codificadora del gen *p53*) puede ser revertida por folato. También participa en el mantenimiento de la integridad del DNA, protegiéndolo de roturas cromosómicas; por otro lado, se han asociado deficiencias en folato a alteraciones de los mecanismos de reparación del DNA (Choi y Mason, 2000).

1.2 INFLUENCIA DE LA DIETA EN EL CÁNCER DE COLON

La historia acerca de la influencia de la dieta en el hombre es una de las más ampliamente documentadas en el tiempo. Ya en el Antiguo Testamento, se describen los efectos en la fisionomía de distintos individuos alimentados con diferentes tipos de dietas (Daniel, siglo VI A.C). Desde entonces, el conocimiento en esta área se ha ampliado enormemente. Actualmente, en relación con los procesos tumorigénicos, la dieta está considerada para el hombre como la mayor fuente de exposición a potenciales carcinógenos medioambientales. Numerosos estudios correlacionan el riesgo de padecer cáncer de colon con los hábitos alimentarios de cada individuo. Estudios epidemiológicos han establecido una correlación directa entre la mortalidad por cáncer colorrectal y el consumo *per capita* de calorías, de proteínas cármicas, de grasa y del aceite de la dieta, así como con la elevación del

nivel de colesterolemia y la mortalidad por cardiopatía isquémica (Honda y col., 1999). Las variaciones geográficas en la incidencia no parecen relacionadas con diferencias genéticas, puesto que distintos estudios llevados a cabo sobre poblaciones migratorias convergen en la idea de que la incidencia a padecer cáncer se iguala con los valores que presentan los individuos del país de destino (Thomas y Karagas, 1987). La dieta y/o los hábitos de vida, por tanto, juegan un papel clave en la carcinogénesis, en especial la que implica a carcinomas colorrectales, pudiéndose incrementar o reducir el riesgo de sufrir este tipo de cáncer. En general, dietas ricas en grasas animales y en carnes rojas se asocian con un mayor riesgo a padecer cáncer de colon (Lichtenstein y col., 1998) mientras que el consumo diario de un mayor porcentaje de vegetales y frutas previene la formación de este tipo de tumores (DeMarini, 1998; Franceschi y col., 1998).

Los mecanismos propuestos acerca de la influencia de las grasas en la carcinogénesis son muy variados y controvertidos (Willett, 1998; Honda y col., 1999). Posiblemente, el efecto más aceptado es que la ingesta de una dieta rica en grasa estimula la descarga de la bilis. Los ácidos y las sales biliares primarios son transformados en secundarios los cuales pueden alterar el crecimiento del epitelio intestinal actuando como agentes carcinogénicos o promotores tumorales (Fracchia y col., 1999). El efecto protector de los estrógenos (Figura 3) se ha relacionado con una reducción de la cantidad de ácidos biliares secundarios. Por otro lado, se ha observado que el desarrollo de una actividad física intensa reduce el riesgo de padecer cáncer de colon. Por ello, parece que, al menos un porcentaje de la incidencia de cáncer colorrectal atribuida previamente al consumo de grasa, podría ser debida al tipo de vida sedentaria. Esto sugiere, como establecen otros estudios, que la asociación debería establecerse más con el balance ingesta/consumo de energía que con la naturaleza del nutriente ingerido (Thompson y col., 1999).

Se han descrito múltiples efectos directos por los que las grasas podrían inducir carcinogénesis. Entre otros, cabe destacar un incremento en la formación de eicosanoides, la generación de radicales libres e interacciones directas entre los ácidos grasos y el DNA genómico (Wynder y col., 1997). En numerosos estudios, utilizando modelos animales, se ha analizado el efecto de dietas ricas en algún tipo particular de ácidos grasos, como por ejemplo ácidos grasos saturados, ácidos grasos poliinsaturados ω -6 (ácido linoleico, aceite de maíz) y ω -3 (eicosapentanoico, aceite de pescado). En estos trabajos se contemplan los efectos moleculares que provocan estas dietas que podrían dar cuenta de actividades promotoras de la carcinogénesis, como pueden ser la activación de la COX-2 o la producción de eicosanoides, la modulación de la actividad de *ras* o la inducción de la apoptosis (Collett y col., 2001; Rao y col., 2001). En cualquier caso, lo que sí parece ampliamente aceptado es el papel protector de la fibra de la dieta en la carcinogénesis colorrectal. De hecho, el papel carcino-protector de

alimentos como los vegetales, legumbres y fruta, aún sin descartar efectos de otra naturaleza como la presencia de flavonoides protectores, se fundamenta en el alto porcentaje de fibra que contienen (Steinmetz y Potter, 1996; Pool-Zobel y col., 1997).

El término “fibra de la dieta” fue acuñado por Trowell en 1976. Así, tradicionalmente se definió como los polisacáridos distintos del almidón que forman parte de la pared de las células vegetales y que son resistentes a las enzimas digestivas humanas. Sin embargo, esta definición es limitada ya que no incluye todas las sustancias que son física o químicamente similares a la fibra de la dieta y que ejercen los mismos efectos fisiológicos (Davidson y McDonald, 1998). Los cereales, legumbres, vegetales, frutas, frutos secos y semillas son ricos en fibra. La fibra no es una sustancia homogénea sino que está formada por un grupo de compuestos químicamente distintos (polisacáridos distintos del almidón, celulosa, hemicelulosa, -glucanos, pectinas, gomas, mucílagos, ligninas, etc.). Existen diferentes tipos de fibras que se clasifican en solubles e insolubles y se diferencian entre sí por sus propiedades físicas. Así, la fibra soluble incluye las pectinas, gomas y hemicelulosas, y se caracteriza por su capacidad para formar geles viscosos en el tracto intestinal. La fibra insoluble (celulosa y ligninas) no exhibe viscosidad pero aporta volumen a las heces. Ambas formas pueden unir cationes minerales o ser utilizadas como sustratos fermentables por la microflora del colon (Davidson y McDonald, 1998). Aunque no se digiere, la fibra de la dieta desempeña un papel nutricional clave ya que su presencia es fundamental para el mantenimiento de la integridad funcional del tracto gastrointestinal. Además, las fibras fermentables por la flora bacteriana se transforman, entre otros productos, en ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) que son absorbidos y utilizados como fuente de energía por el epitelio del colon, el músculo esquelético y por el tejido hepático (Livesey, 1990; Cummings, 1998).

El papel protector de la fibra en la carcinogénesis colorrectal se ha atribuido, desde hace tiempo, a su capacidad para incrementar la estructuración de las heces y para promover la motilidad intestinal, disminuyendo la concentración y el tiempo de exposición de potenciales carcinógenos presentes en la dieta (Burkitt, 1971). En este sentido, distintos estudios *in vitro* muestran también que varios tipos de fibras pueden unir carcinógenos y potenciales promotores de tumores (Smith-Barbaro y col., 1981; Gulliver y col., 1983). Sin embargo, cada vez son más los estudios que apuntan hacia los ácidos grasos de cadena corta, en especial el ácido butírico, obtenidos durante la fermentación de la fibra, como los responsables principales del papel carcino-protector que se le atribuye a la dieta rica en fibras (Clausen, 1995; Velázquez y Rombeau, 1997). El ácido butírico es un ácido débil (pKa 4,81) por lo que en el entorno fisiológico se encuentra en la forma ionizada; la nomenclatura utilizada en esta Memoria para referirse al ácido butírico será la de **butirato**.

1.3 EL BUTIRATO

1.3.1 Obtención, absorción y metabolismo del butirato

La principal fuente de butirato para el hombre procede de alimentos como la leche, la mantequilla, el aceite de oliva y, de un modo indirecto aunque mayoritario, también se obtiene por fermentación de la fibra de los vegetales, las legumbres, las frutas y los cereales. La fibra de la dieta, como se ha comentado, es transformada por la flora bacteriana en distintos productos (Cummings y Macfarlane, 1997). Así, la fermentación de hidratos de carbono produce fundamentalmente ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato), hidrógeno y CO_2 . La fermentación intestinal de proteínas (pancreáticas, secretadas por las bacterias, o productos de lisis bacteriana) produce, además de los ácidos grasos anteriormente mencionados, otros de cadena corta ramificados (isobutirato, isovalerato y 2-metilbutirato), amoníaco, aminas y fenoles, junto con otros ácidos orgánicos. En algunas circunstancias se pueden acumular otros intermedios, tales como lactato, etanol, succinato y α -cetoácidos (Macfarlane y Gibson, 1994).

Desde el punto de vista nutricional, uno de los principales ácidos grasos de cadena corta producto de la fermentación bacteriana es el butirato, obteniéndose alrededor de 100 mmoles de este ácido graso por día (revisado en Pouillart, 1998). El butirato obtenido es rápidamente absorbido en el intestino grueso, principalmente a nivel del ciego y del colon. Este proceso es realizado por los colonocitos, que capturan el butirato en la forma protonada mediante difusión pasiva a través de la membrana apical. Distintos estudios muestran también la existencia en la membrana apical de un intercambio butirato $^-$ - HCO_3^- , sugiriendo la presencia de un transporte facilitado para este ácido graso (Sehested y col., 1999). El intercambio de una base fuerte (HCO_3^-) por un ácido débil (butirato $^-$), disminuye el pH intracelular, lo que estimula, a su vez, el intercambio apical electroneutro Na^+ - H^+ . La salida del H^+ corrige el pH intracelular e induce la absorción de Na^+ , que es transportado basolateralmente a través de la Na^+ - K^+ -ATPasa estimulando la absorción de agua. De este modo, el butirato estimula la absorción de Na^+ y juega un papel integral en la recuperación de fluidos y electrolitos en el colon. Un esquema de los mecanismos de absorción del butirato se muestra en la figura 4.

En el interior de la célula, el butirato se metaboliza vía β -oxidación, constituyendo la principal fuente de energía de los colonocitos. Se estima que entre un 60-80 % de la energía consumida por estas células proviene de la metabolización de este ácido graso (Cummings y MacFarlane, 1997). Deficiencias en la β -oxidación son la causa de la colitis ulcerosa; los individuos que la padecen tienen un epitelio atrófico que puede degenerar en la formación de tumores (Hague y col., 1997). Finalmente, el butirato no metabolizado es enviado a la

circulación portal tras su paso por la membrana basolateral mediante difusión pasiva o por transporte facilitado a través del intercambio butirato/ HCO_3^- (distinto al de la membrana apical) siendo capturado y metabolizado en el hígado. Además, el butirato puede ser secretado a través de la leche materna, el sudor y las heces fecales (Pouillart, 1998).

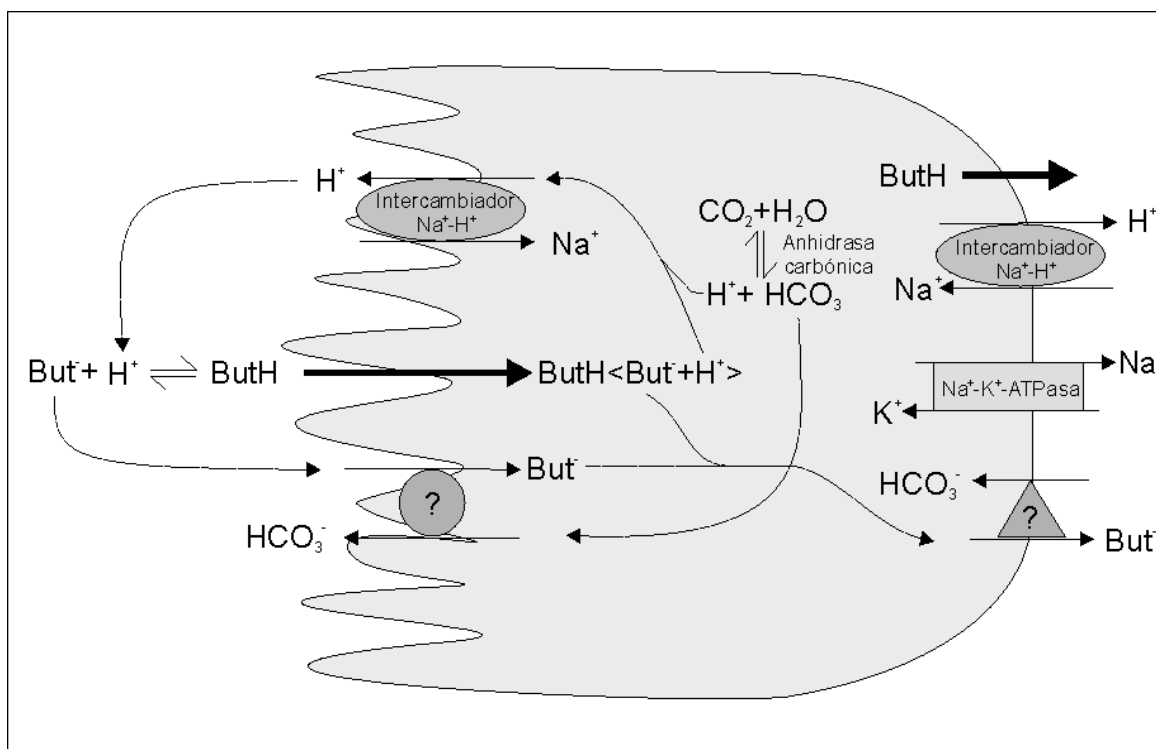


Figura 4.- Absorción de butirato en los colonocitos.

Se recogen los mecanismos de transporte a través de la membrana epitelial del butirato y su interacción con el transporte de sodio y bicarbonato. El grosor de las flechas indica la importancia de cada vía en el proceso de absorción de este ácido graso. No obstante, algunos de los mecanismos son todavía especulativos. ButH representa la forma no disociada del butirato y But⁻ la forma desprotonada. Las figuras geométricas simbolizan distintos tipos de transportadores, algunos de los cuales todavía no han sido caracterizados. [Modificado de von Engelhardt y col. (1998)].

1.3.2 Efectos *in vivo* e *in vitro*

El butirato, *in vivo*, es esencial para el mantenimiento de la integridad física y funcional de la mucosa intestinal. Distintos estudios muestran que estimula la proliferación de las células de las criptas aunque este efecto se encuentra restringido a los dos tercios inferiores de las mismas (Bartram y col., 1993). Esta es la región donde normalmente se encuentran las células en división. Por lo tanto, aunque este agente estimula la proliferación de las células del epitelio

del colon, al actuar en un área restringida no está considerado como promotor de tumores. Por el contrario, el ácido desoxicólico induce la expansión de la zona superior de las criptas y es considerado como un agente carcinogénico (Velázquez y Rombeau, 1997). Asimismo, también se ha descrito que el butirato favorece el rápido recambio de las células hijas, situadas en la parte más expuesta de las criptas, promoviendo su diferenciación y apoptosis. El distinto efecto local ejercido por el butirato se postula que puede radicar en la exposición a distintas concentraciones del agente. La zona superior de las criptas, al estar en contacto directo con el lumen, está sometida a concentraciones altas de butirato; sin embargo, la zona inferior, al estar menos expuesta, se encuentra en presencia de concentraciones menores de agente (Csordas, 1996).

Por otro lado, está ampliamente descrito que el butirato *in vitro* inhibe la proliferación celular y promueve la diferenciación y apoptosis en numerosas líneas celulares transformadas de colon y de otros orígenes tisulares (Saito y col., 1998; Schwartz y col., 1998; Rickard y col., 1999). En estos estudios, concentraciones que promueven *in vivo* la proliferación celular dan lugar al efecto contrario. Esto ha llevado a discutir en muchas revisiones acerca de lo que se ha dado en llamar la “*paradoja del butirato*” (Hague y col., 1997; Russo y col., 1999). La mayoría de las explicaciones dadas para justificar este hecho se basan en las propias características del cultivo *in vitro* de las células. En este sentido, hay que tener en cuenta que las células se propagan en presencia de concentraciones altas de glucosa (entre 1 y 4,5 g/l), constituyendo este metabolito su principal fuente de energía. Así, *in vitro*, las células podrían utilizar el butirato con fines distintos del energético y de ello dependería su capacidad para inducir apoptosis o estimular la proliferación (Hague y col., 1997; Shing y col., 1997). Por otro lado, el entorno *in vivo* de las células, formando las criptas, es muy diferente al de las células de un cultivo *in vitro*, formando monocapas, siendo por tanto el grado de exposición a la misma concentración de agente muy diferente. En este sentido, la mucosa intestinal intacta podría estar protegida a través de la barrera de mucinas, la cuál podría reducir los niveles de butirato en contacto con las células (Hague y col., 1997).

Mecanismo de acción

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo mediante el cual el butirato ejerce su efecto, parece ser que la inhibición que provoca sobre la desacetilasa de histonas media muchos de los efectos que se le atribuyen. La inhibición de esta enzima provoca la hiperacetilación de las histonas, fundamentalmente de las histonas H3 y H4. La presencia de un gran número de grupos acetilo en las histonas, neutraliza la carga positiva que presentan y provoca una desestabilización de la interacción iónica con el DNA. La disminución de la afinidad de las histonas por el DNA incrementa el acceso de factores de transcripción y la activación de genes específicos (Clausen, 1995). De este modo, se puede explicar la

modificación de la expresión de un gran número de proteínas tras exposición a butirato (Shack y col., 1996; Saito y col., 1998; Gibson y col., 1999). En la tabla III se recogen algunas de las proteínas cuya expresión se modula directamente por el butirato, aunque el efecto es dependiente de la línea celular. Por ejemplo, los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2, tras la exposición a butirato disminuyen en unas células mientras que se induce en otras. Se han propuesto otros mecanismos de actuación para el butirato tales como la modificación de la estructura de la cromatina por modulación de la fosforilación de histonas y el incremento de la transcripción al disminuir la metilación del DNA (Boffa y col., 1981; Whitlock y col., 1983).

La hiperacetilación de histonas parece mediar los procesos de inhibición de la proliferación celular y la potenciación de la diferenciación celular que provoca el butirato en numerosas líneas tumorales. Yoshida y colaboradores (1990), al utilizar otro inhibidor de desacetilasas, la tricostatina A (no relacionado estructuralmente con el butirato), observaron que ésta, no solo provoca una hiperacetilación de histonas similar a la del butirato, sino que también mimetiza al mismo tiempo la inhibición de la proliferación y la inducción de diferenciación provocada por el ácido graso. También parece que es necesaria una modificación extensa por hiperacetilación para originar la inhibición de la proliferación, mientras que sólo se requiere una acetilación transitoria en una región delimitada de la cromatina para que se induzca el proceso de diferenciación.

Por otro lado, el efecto que ejerce el butirato sobre la acetilación de histonas también se ha relacionado con el proceso de apoptosis. En las condiciones de hiperacetilación, como se ha comentado antes, ciertas regiones del DNA están más accesibles y, además de poderse activar genes relacionados con muerte celular, se puede facilitar también la acción de endonucleasas que degraden el DNA. En este contexto, también se ha descrito que la inducción de apoptosis en células, tras tratamiento con butirato, está provocada por alteraciones en los niveles de proteínas de la familia de Bcl-2 (Litvak y col., 1998) y/o por un incremento en los niveles de caspasa 3 (Heerdt y col., 1998). Este incremento en los niveles de caspasa 3 está, a su vez, relacionado directamente con la hiperacetilación de histonas inducida por el butirato (Medina y col., 1997).

Dentro de las proteínas descritas como responsables de la inhibición de la proliferación que ejerce el butirato sobre numerosas líneas tumorales se encuentra la **proteína p21**. La inducción de esta proteína acontece de manera temprana y se produce como consecuencia de la activación transcripcional en el sitio Sp1 del promotor del gen que codifica para p21 (Nakano y col., 1997). La hiperacetilación de histonas provocada por el butirato parece ser, al menos en parte, la responsable de esta activación (Archer y col., 1998).

Tabla III.- Algunas proteínas cuya expresión o actividad está modulada por butirato.

PROTEÍNA	LÍNEA CELULAR
Ciclo celular	
ciclina D3	HT29
p27	Caco2, HepG2 y HepG3
p16	LS174T
p21	HT29, SW640, Caco2, LIM1215
cdc25c	Caco2
fosforilación de Rb (proteína de retinoblastoma)	LIM1215, LS174T
actividad de timidina quinasa	LS174T
PCNA (<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>)	MCF7
Grado de diferenciación	
MUC3 (mucina tipo 3)	HT29
CEA (antígeno carcinoembrionario)	HT29, Caco2
ALP (fosfatasa alcalina)	HT29, Caco2, LIM1215, LS174T
lactasa	14 líneas celulares colorrectales
trehalasa	14 líneas celulares colorrectales
Apop tosis	
caspasa 3	Caco2, LIM1215, JURKAT, Y79
Bax	Y79
Bcl-X _L	Caco2
citocromo c mitocondrial	Y79
Bcl-2	SW480, HCT-116, HCC, Caco2
p53	Caco2, Y79, HCC-T, HCC-M.
Protoncogenes	
<i>c-myc</i>	MCF7, KB-3-1
<i>c-myb</i>	Caco2, LIM1215
<i>src</i>	SW620
Resistencia a drogas	
mdr1 (<i>multidrug resistance 1</i>)	SW640, DLD-1, LS180, HCT-15
LRP (<i>lung resistant phenotype</i>)	SW620
glicoproteína P (y su activación en algún caso)	SW640, DLD-1, LS180, Clon A
Otras	
COX-2 (cicloxigenasa 2)	HT29 y PC/AA/C1
PPAR- (<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>)	Caco2
galectina 1 y 3	LNCaP y KM12
queratina 18	SW613-B3
secreción de IL-8 (interleuquina 8)	Caco2
fosforilación y actividad de PKC (<i>protein kinase C</i>)	HT29
fosforilación de GSK-3 (glucógeno sintasa quinasa 3)	HT29
carboxipeptidasa A3	PC-3
-globina	eritroblastos
secreción de IGFB P-2 (<i>insulin-like growth factor binding protein</i>)	Caco2
15-lipoxigenasa	Caco2
TIMP-1 y- 3 (<i>TissueinhibitorMatrixMetalloproteinase</i>)	SW116
HSP70 y 28 (<i>Heat Shock Protein</i>)	K562
PAF (factor activador de plaquetas)	Eol-1
GLUT 1 (transportador de glucosa1) y transporte de glucosa	HepG2
fosforilación de ERK y JNK	K562
activación de uPA (activador de plasminógeno tipo uroquinasa)	HBECs, SW620, MDA-MB-231.
secreción de IGFB P-3 (<i>insulin-like growth factor binding protein</i>)	Caco2
receptor 2-adrenérgico	HT29
MMP-9(<i>Matrix Metalloproteinase</i> 9)	SW116
-galactósido -2,6-sialiltransferasa y la actividad	HepG2, Hep3B

Esta proteína pertenece a la familia de inhibidores de complejos ciclina-proteína quinasa dependiente de ciclina (ciclinas-CDK). Estos se clasifican en dos grupos según su estructura y las características funcionales. La familia Kip, que incluye a las proteínas p21, p27 y p57, comparten un dominio amino terminal muy conservado e inhiben un amplio espectro de CDKs por unión a los complejos ciclina-CDK (ciclina D/CDK4 ó 6, E/CDK2 y A/CDK2). La familia INK4 incluye las proteínas p16, p15, p18 y p19 que inhiben a CDK4 y CDK6 por unión a la subunidad CDK (Yamamoto y col., 1999). Además de inhibir una gran variedad de complejos ciclinas-CDKs, la proteína p21 puede actuar directamente sobre el DNA inhibiendo la replicación tras su unión a PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), una subunidad de la DNA polimerasa (Waga y col., 1994).

La expresión de la proteína p21 se induce por una gran variedad de agentes entre los que se incluyen inhibidores de la proliferación e inductores de la diferenciación, agentes genotóxicos y sustancias estimuladoras del crecimiento (Gorospe y col., 1996a). No obstante, la expresión de la p21 está estrictamente regulada. A nivel transcripcional, la regulación puede ser dependiente de la proteína p53, ya que contiene dos sitios de unión para esta proteína y su interacción provoca una sobreexpresión de la p21; o bien, independiente de la p53, como en el caso de la inducción por butirato (Archer y col., 1998). Secuencias consenso de unión de Sp1, así como la participación de la familia MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) estarían implicadas en la regulación de p21 independiente de p53 (Gorospe y col., 1996a). Además, la presencia de factores que incrementan la estabilidad del RNA de p21 (Gorospe y col., 1996b) y la modulación de la unión a PCNA por fosforilación de p21 (Scott y col., 2000) ponen de manifiesto otros puntos de regulación a nivel post-transcripcional y de la traducción. La función de p21 se asocia fundamentalmente con la inhibición que ejerce sobre el crecimiento celular de numerosas líneas celulares (Janson y col., 1997; Archer y col., 1998) aunque también está implicada en procesos de diferenciación (Siavoshian y col., 2000). Su papel durante la apoptosis, sin embargo, ha sido objeto de controversia ya que se ha sugerido tanto un papel protector como inductor de apoptosis (Gorospe y col., 1997; Chai y col., 2000).

1.3.3 El butirato como agente antitumoral

Por los efectos que produce en las células tumorales, el butirato puede ser utilizado en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, su utilización resulta contradictoria; en algunos casos, actúa sinérgicamente con el carcinógeno obteniéndose un mayor número de tumores en el colon de ratas (Freeman, 1986). En este tipo de experimentos hay que tener en cuenta que la administración masiva de un carcinógeno para obtener un alto rendimiento en el número de tumores en un plazo razonable, supone una situación artificial que nada tiene que ver con la larga acumulación en el tiempo de las mutaciones que fisiológicamente dan lugar a un tumor

de colon humano. Otros estudios, no obstante, están de acuerdo con el papel protector del butirato, aunque depende de la concentración local obtenida de este agente tras la administración de diferentes tipos de fibras (McIntyre y col., 1993). El butirato también se puede utilizar para sensibilizar células que presentan resistencia a otros agentes (Shack y col., 1996) aunque se ha descrito también que contribuye a incrementar el fenotipo MDR (*MultiDrug Resistence*) induciendo la síntesis y la activación de la glicoproteína P (Frommel y col., 1993).

La administración parenteral de butirato en pacientes con cáncer no ha aportado resultados satisfactorios debido a su baja vida media en el plasma (5 minutos) (Daniel y col., 1989). Para prolongar su permanencia se están desarrollando análogos de este agente más estables (isobutiramida, 4-fenilbutirato, tributirina) (Pouillart y col., 1998) y se utilizan terapias combinadas con agentes como el interferón que amplifican sus efectos (Miyachi y col., 1999). No obstante, se han ideado métodos para el mantenimiento de niveles adecuados de este agente en los pacientes aunque, como se recoge en la literatura, estas personas desarrollan un olor socialmente inaceptable. A pesar de estos inconvenientes, más de 200 personas han sido tratadas con butirato y los parámetros clínicos, en particular en estados avanzados de la enfermedad, no se han deteriorado incluso cuando la terapia no ha sido efectiva (Pouillart, 1998).

1.4 APOPTOSIS

El principal mecanismo por el cual el butirato está considerando como un posible agente antitumoral es la capacidad que tiene de generar señales celulares a través de las cuales se desencadena el programa de apoptosis, o muerte celular programada, en numerosas líneas celulares. La apoptosis es el principal mecanismo fisiológico de muerte celular e implica la activación de mecanismos específicos que conducen a la muerte natural de las células de los distintos tejidos. De este modo, constituye una parte integral en el proceso de recambio celular participando en la eliminación de células sobrantes (durante el desarrollo embrionario, en el epitelio gastrointestinal, etc.), dañadas o aberrantes (alteraciones en las bases de DNA, estructuras de DNA alteradas por unión de agentes intercalantes, etc.). El programa de apoptosis se desarrolla en dos etapas: en la primera, o **etapa de determinación**, la célula reacciona ante un estímulo determinado o ante su ausencia (señales de desarrollo, estrés celular, alteración del ciclo celular, etc.) decidiendo iniciar el proceso de apoptosis; en la segunda, o **etapa de ejecución**, la célula sufre un conjunto de alteraciones moleculares que desencadenan la muerte celular (para revisión ver Heemels, 2000).

En las células apoptóticas se han descrito alteraciones como: disminución de la adhesión celular y de los contactos intercelulares, pérdida de estructuras especializadas de la superficie celular (por ejemplo, los *microvilli*), cambios en la distribución de fosfolípidos de la membrana plasmática con formación de protusiones, reducción del volumen celular, condensación de la cromatina con una distribución marginal alrededor de la envoltura nuclear, agregación de los poros nucleares y disolución focal de la lámina nuclear. Finalmente, se produce una escisión de la célula en múltiples estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, constituidos por partes del citoplasma rodeados de membrana plasmática. Todo este proceso ocurre sin liberación del contenido citoplasmático u orgánulos subcelulares al medio exterior ya que, a diferencia de la muerte celular por necrosis, no se produce rotura de la membrana plasmática (Motyl, 1999; Wyllie, 1999). En el ámbito fisiológico, los cuerpos apoptóticos son retirados del espacio extracelular por los macrófagos mediante fagocitosis y, por tanto, no cursa ningún proceso de respuesta a daño celular o inflamación (Savill y Fadok, 2000).

1.4.1 Caspasas

La maquinaria de transmisión de las señales apoptóticas es muy compleja. Se puede iniciar a través de distintas vías, dependiendo del estímulo recibido por la célula (Figura 5). Una vez iniciada la señal, ésta se transmite a través de distintas proteínas adaptadoras. Sin embargo, todas las señales convergen al final en la activación de una familia de cisteín-proteasas, denominadas caspasas, que son las encargadas, en último término, de ejecutar el proceso de muerte celular. La implicación de estas proteasas en los procesos de apoptosis está ampliamente documentada (Giuliano y col., 1999; Chai y col., 2000)

Clasificación, estructura y activación

Hasta el momento, en mamíferos se conocen 13 miembros de esta familia de proteínas aunque sólo 11 se han descrito en humanos. El análisis filogenético revela que existen dos subfamilias de caspasas (Earnshaw y col., 1999). La subfamilia de la caspasa 1 (caspasas 1, 4, 5 y 13), que parecen estar implicadas en el control de la inflamación, y la subfamilia de la caspasa 3 (caspasas 3 y 6-10), que están especializadas en los procesos de apoptosis. La caspasa 2 es estructuralmente similar a la subfamilia de la caspasa 1 pero su función la sitúa junto con la subfamilia de la caspasa 3. Las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos con la estructura general que se muestra en la figura 5. Se pueden distinguir tres dominios: el prodominio amino terminal, la subunidad grande (de aproximadamente 20 kDa) y la subunidad pequeña (de 10 kDa). La longitud del prodominio es muy variable y está implicado en la regulación de la activación. Aquellas caspasas que poseen un prodominio largo parecen estar implicadas en la iniciación del proceso de apoptosis y se denominan **caspasas iniciadoras** (caspasas 2, 8, 9 y 10), mientras que, aquellas con un prodominio corto son activadas por las

iniciadoras para ejecutar el programa de apoptosis y se las conoce como **caspasas efectoras** (caspasas 3, 6 y 7) (Earnshaw y col., 1999).

Las caspasas se activan una vez iniciadas las distintas vías de señalización del programa de apoptosis. La activación de cada caspasa requiere un mínimo de dos roturas proteolíticas: una, en la que se separa el prodominio del resto de la molécula, y otra, por la que se obtiene la subunidad grande y la pequeña. Estos cortes, en los que están implicados residuos de aspártico, ocurren de un modo ordenado y van seguidos de una asociación de dos de cada una de estas subunidades para formar una estructura tetramérica (Figura 5). Esta asociación puede ser homo- o heterodimérica generando una enzima con dos centros activos con una especificidad absoluta de corte detrás de un residuo de aspártico, de ahí el nombre que reciben (*caspases: cystein-dependent aspartate-directed proteases*). Todo esto implica que estas enzimas pueden ser activadas bien autocatalíticamente o bien en cascada por otras enzimas con especificidad similar.

Rutas de señalización del proceso de apoptosis

Una **primera ruta de señalización** del proceso de apoptosis tiene su origen en la membrana celular a través de lo que se conoce como **receptores de muerte** (Figura 5). La señal se inicia tras la unión de distintos ligandos (FasL, TNF, etc.) a sus respectivos receptores de muerte transmembrana (Fas, TNFR1, etc.) (Ashkenazi y Dixit, 1998). La unión del ligando provoca la homotrimerización del receptor y, de este modo, el receptor de muerte es capaz de reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular. Este proceso implica la interacción homofílica entre dominios de muerte DDs (*Death Domains*) de los receptores y los de las moléculas adaptadoras (Saikumar y col., 1999). A su vez, las moléculas adaptadoras poseen secuencias específicas DEDs (*Death Effector Domain*) capaces de interactuar homofílicamente con algunos miembros de la familia de las caspasas provocando su activación (Muzio y col., 1996). Así, la activación de la pro-caspasa 8 requiere su asociación con la molécula adaptadora FADD a través de los dominios DED, situándose la caspasa 8 en la vía apoptótica mediada por receptor de muerte (Muzio y col., 1996; Medema y col., 1997). También parece estar implicada en esta vía la caspasa 2.

La mayor parte de los estímulos apoptóticos utilizan una **segunda ruta de señalización** que se conoce como **vía mitocondrial**, que está regulada por proteínas de la familia Bcl-2 (Figura 5). En esta vía se modifica la permeabilidad mitocondrial produciéndose la liberación de dos proteínas apoptogénicas, citocromo c y AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*), así como la generación de un flujo de calcio y liberación de especies reactivas de oxígeno. AIF es una proteasa que, por sí misma, es capaz de activar a la caspasa 3 y a endonucleasas *in vitro* (Kroemer, 1997). A diferencia de AIF, el citocromo c (también denominado Apaf 2) necesita

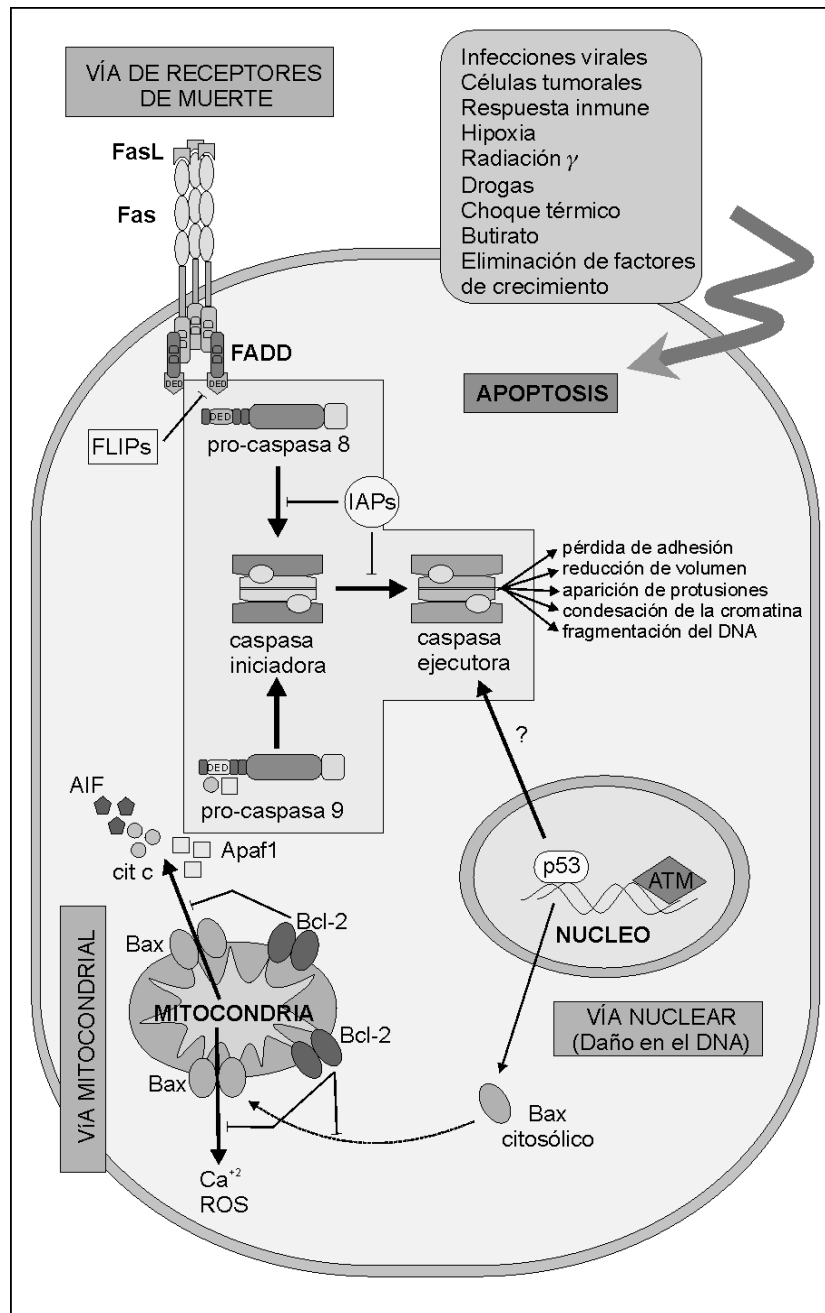


Figura 5.- Vías de señalización que conducen al proceso de apoptosis

Dependiendo del tipo de estímulo apoptótico, se activa una de las tres rutas encargadas de iniciar la cascada de señales del programa de apoptosis. La **vía de receptores de muerte** se inicia en la membrana plasmática tras la unión de distintos ligandos (por ejemplo, FasL) a sus respectivos receptores de muerte (Fas). Este hecho provoca la homotrimerización del receptor que, a través de proteínas adaptadoras (como FADD), activa a la pro-caspasa 8. En la **vía mitocondrial**, la familia de Bcl-2 regula la liberación de calcio, ROS (especies reactivas de oxígeno) y proteínas apoptogénicas (citocromo c, Apaf1 y AIF) que pueden activar a la pro-caspasa 9. La activación de las pro-caspasas implica la liberación del prodominio y la ruptura proteolítica de la subunidad grande (morado) y la subunidad pequeña (rosa), con la posterior asociación de dos subunidades grandes y dos pequeñas, dando lugar a la especie activa con dos centros catalíticos (verde). Las caspasas iniciadoras activan a las caspasas ejecutoras, que son las responsables de los cambios morfológicos acontecidos durante el proceso de apoptosis. La tercera vía se inicia cuando se produce **daño en el DNA** y está regulada por p53 y ATM. No se conoce su conexión con la cascada de la familia de las caspasas.

interaccionar con la proteína citosólica Apaf 1 (*Apoptotic protease activating factor*) para activar específicamente a la pro-caspasa 9, ejecutando así el programa apoptótico (Motyl, 1999) (Figura 5).

La **tercera vía** de inducción del proceso de apoptosis es la peor caracterizada y se inicia cuando se produce un **daño en el DNA** (Figura 5). Aunque se sabe que está regulada, al menos en parte, por proteínas tales como p53 y ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), no se conoce cómo se produce la activación de las caspasas a través de esta vía (Dragovich y col., 1998, Rich y col., 2000).

Independientemente del mecanismo por el cuál se ha inducido el proceso, la activación de las correspondientes caspasas iniciadoras provoca, a su vez, la activación en cascada de otras caspasas encargadas de ejecutar el programa de apoptosis originando los cambios anteriormente descritos que desencadenan la muerte de la célula. Por ejemplo, la señal apoptótica iniciada en Fas con la activación de la caspasa 8, se traduce por la caspasa 4 en el procesamiento de la pro-caspasa 3 (Kamada y col., 1997). La caspasa 9, por su parte, puede activar a la caspasa 3, 7 y 6 (Li y col., 1997; Earnshaw y col., 1999).

Ejecución del programa de apoptosis

Las caspasas, aunque son extraordinariamente selectivas como proteasas, ejercen su actividad proteolítica sobre un amplio número de sustratos. Se ha sugerido que la proteólisis de muchos de ellos es la responsable de los numerosos cambios metabólicos y estructurales que se desencadenan durante el proceso de apoptosis. Actúan sobre un gran número de proteínas, tanto citoplasmáticas como nucleares, con actividades diversas, tales como: metabolismo y reparación del DNA, fosforilación de proteínas, transducción de señales, regulación del ciclo celular y en proliferación, así como proteínas responsables de enfermedades genéticas humanas y proteínas que participan directamente en apoptosis (Earnshaw y col., 1999). En la tabla IV se recogen algunas de las principales características y posibles sustratos descritos para cada tipo de caspasa.

Regulación del procesamiento y de la actividad de las caspasas

Debido a los efectos letales provocados por las caspasas no es de extrañar que su actividad esté sometida a un estricto control ejercido a distintos niveles. Así, se puede producir una regulación transcripcional; de hecho, distintos agentes, como el interferón γ , afectan a la expresión génica de diferentes caspasas (Tumura y col., 1995). Por otro lado, se han descrito distintos tipos de modificaciones post-traduccionales (nitrosilación, fosforilación, etc.) que pueden modular la actividad de estas proteasas (Earnshaw y col., 1999).

Tabla IV.- Propiedades y sustratos de las distintas caspasas humanas.

Caspasa	Sitio de rotura en el zimógeno^a	Secuencia preferente de proteólisis	Sustrato
Caspasa 1	TPLD /S; FEDD/A; AV QD/N	YEVD-X	Pro-interleuquina-1 , Bcl-X _L
Caspasa 2	DQQD/G; EED/A; DNKD/G	WEHD-X	
Caspasa 3	IETD/S; * ; ESMD/S	VDVAD-X; DEHD-X	Gelsolina, -catenina, p21, citoqueratina 18, Rb, PARP, fosfolipasa A ₂ citosólica, p27, Bcl-X _L , FLIP _L
Caspasa 4	WVRD/S; LEED/A; ?	LEVD-X; (W/L)EHD-X	
Caspasa 5	WVRD/S; LEAD/S; ?	(W/L)EHD-X	
Caspasa 6	DVVD/N; TEVD/A; TETD/A	VEID-N; VEHD-X	citoqueratina 18, laminas
Caspasa 7	IQAD/S; * ; DSVD/A	DEV D-X	citoqueratina 18, PARP, p21, p27
Caspasa 8	VETD/S; LEMD/L; REQD/S	IETD-X; LETD-X	FLIP _L , Bid
Caspasa 9	PEPD/A; DQLD/A; ?	LEHD-X	PARP
Caspasa 10	IEAD/A; * ; SQT D/V	IEAD-X	FLIP _L
Caspasa 13	?	?	?

a: La secuencia de la izquierda corresponde al procesamiento de activación inicial en el carboxilo terminal de la subunidad grande; la segunda secuencia es la región donde se produce la proteólisis que elimina el fragmento de unión que conecta las dos subunidades (*no hay fragmento de unión); la secuencia de la derecha corresponde con la zona del procesamiento del prodominio. ?: desconocido. -: no publicado. (Adaptada de Earshaw y col., 1999).

Además, existen mecanismos específicos de regulación. Por ejemplo, se ha descrito la existencia de una familia de proteínas denominada IAPs (*Inhibitor-of-Apoptosis Protein*) capaces de unirse e inactivar a distintas caspasas. En la actualidad, se conocen 5 miembros de esta familia en mamíferos (cIAP-1, cIAP-2, XIAP, NAIP y la survivina) (Deveraux y Reed, 1999). Asimismo, a través de la vía de señalización de los receptores de muerte, la activación de las caspasas puede ser regulada por FLIP (Figura 5); éste contiene la región DED, lo que le permite unirse al prodominio de la pro-caspasa 8 bloqueando su interacción con los complejos Fas y TNFR1 e interfiriendo en el proceso apoptótico (Irmeler y col., 1997; Srinivasula y col., 1997). Por otro lado, la vía mitocondrial está regulada por la familia de proteínas Bcl-2.

1.4.2 Familia de proteínas Bcl-2

Existen al menos 14 miembros en esta familia de proteínas, los cuales se pueden clasificar en dos tipos según promuevan el proceso de muerte celular (Bax, Bak, Bcl-X_s, Bad, Bid, Bik y Hrk) o lo bloqueen (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1 y A1). La característica estructural común de estas proteínas es la presencia de regiones homólogas Bcl-2 denominadas BH (BH1-BH4). Así, los dominios BH1 y BH2 se encuentran presentes en todas estas proteínas. Sin embargo, BH4 está presente exclusivamente en la subfamilia antiapoptótica y la secuencia del dominio BH3 es diferente en las proteínas pro- y anti-apoptóticas (Konopleva y col., 1999; Hengartner, 2000). Estas regiones determinan la capacidad para interactuar entre ellos, formando homo- y heterodímeros, o con otras proteínas no relacionadas. Sin embargo, el efecto ejercido sobre el proceso de apoptosis parece no correlacionarse con el número y tipo de heterodímeros, sino con los niveles libres de Bax y Bcl-2 (Motyl, 1999).

Los efectos de prevención de apoptosis ejercidos por Bcl-2 y de promoción por Bax son dependientes de su interacción con membranas. Por ello, la mayor parte de estas proteínas poseen un dominio carboxilo terminal transmembrana (excepto Bid y Bad) que facilita su inserción en membranas intracelulares (la cara externa de la membrana mitocondrial, el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear). La similitud estructural de Bcl-X_L con los dominios de formación de poros de la toxina de la difteria y de las colicinas A y E1, sugiere que Bcl-X_L y otros miembros de la familia pueden regular la apoptosis a través de la formación de poros (Muchmore y col., 1996). En este sentido, se ha descrito que Bcl-2 puede regular el flujo de protones para mantener el potencial de membrana mitocondrial en presencia de estímulos que provocan una disminución de este potencial (Shimizu y col., 1998). La inducción de apoptosis implica que la proteína Bax citoplasmática migra y se une a la membrana mitocondrial, lo que da lugar a la formación de poros que incrementan la permeabilidad mitocondrial y permiten la liberación de los factores apoptogénicos (AIF, citocromo c, calcio, especies reactivas de oxígeno, etc.). El mecanismo que media los efectos de Bcl-2 parte probablemente de su situación en la membrana externa mitocondrial. En esta posición previene de la incorporación de Bax e impide la liberación de factores que desencadenarían el proceso apoptótico (Konopleva y col., 1999).

1.4.3 Apoptosis y cáncer

Las alteraciones en la regulación del programa de apoptosis son un denominador común de un gran número de enfermedades, pudiendo darse tanto un exceso como una deficiencia de

apoptosis. En el caso de las células tumorales, la progresiva adquisición de una resistencia a la inducción natural de apoptosis va asociada al establecimiento del fenotipo maligno. Un gran número de datos bibliográficos apoyan este hecho (Jäättelä, 1999; Ravi y col., 2000). Así, durante la transformación del epitelio del colon hacia carcinoma se detecta un progresivo bloqueo en la inducción de apoptosis a medida que se incrementa la malignidad del tejido (Bedi y col., 1995). Estos cambios normalmente se traducen en alteraciones en los niveles de expresión de las distintas proteínas que regulan o participan en el proceso de apoptosis, fundamentalmente de proteínas de la familia Bcl-2 (Krajewski y col., 1999). Asimismo, alteraciones en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en ciertos tumores se han correlacionado con la resistencia a quimioterapia (Minn y col., 1995; Wyllie, 1999).

1.5 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las células de los organismos reaccionan ante estímulos que supongan un estrés para la célula, ya sea de tipo físico-químico (hipertermia, estrés oxidativo, radiaciones ultravioletas, etc.) como fisio-patológico (fiebre, infecciones, metabolitos tóxicos, malignización, acúmulo de proteínas anormales, etc.) (Schlesinger y col., 1990; Fuller y col., 1994). Estos estímulos inducen una respuesta protectora que, según la complejidad del sistema, involucra distintos procesos; la célula protege, por una parte, su dotación genética (reparación nucleotídica en eucariontes) y, por otra, las estructuras proteicas que la integran. Es la denominada **respuesta de choque térmico** o **respuesta al estrés** (*Heat Shock Response* o *Stress Response*) (Morimoto y col., 1994). Ésta consiste en una reprogramación rápida y transitoria de las actividades celulares para asegurar la supervivencia durante el período de estrés, protegiendo a los componentes esenciales y permitiendo un rápido reestablecimiento de las actividades celulares normales durante el período de recuperación. Este proceso es el resultado de la expresión inducida de diversos genes, entre cuyos productos se encuentran las denominadas **proteínas de choque térmico** (*Heat Shock Proteins, HSPs*) (Mager y col., 1993). Estas proteínas protegen a la célula y al organismo de dicho estrés y están encargadas de mantener las estructuras nativas funcionales de otras proteínas que son claves para la supervivencia. La inducción de las HSPs tiene un carácter de respuesta de emergencia, siendo rápida y masiva (Lindquist y col., 1996).

1.5.1 Clasificación, función, estructura y regulación de las proteínas de choque térmico

Las HSPs son uno de los grupos de proteínas intracelulares más conservadas a lo largo de la evolución (Jèrôme y col., 1993). Aunque las proteínas de choque térmico se sintetizan en cantidades elevadas en las células agredidas, la mayoría de las proteínas de estrés se

sintetizan en cantidades basales en condiciones fisiológicas normales, participando en el control del ciclo celular, en los procesos de proliferación y diferenciación celular, etc. (Morimoto y col., 1990;1993; Kuhl y Rensing, 2000). Tanto en condiciones normales como durante la respuesta al estrés, las HSPs participan en el establecimiento de las interacciones proteína-proteína requeridas en la adquisición y mantenimiento del plegamiento proteico, en los procesos de translocación, en la prevención de la formación de agregados proteicos inapropiados y en la degradación de proteínas (Agashe y Hartl, 2000).

Las cadenas polipeptídicas nacientes, tanto en el citosol como en la luz del retículo endoplásmico, no se pliegan de forma inmediata; se unen a **caperonas moleculares** (caperonas y caperoninas) cuya función fisiológica es la de minimizar la agregación proteica y asegurar su correcto plegamiento y transporte (Agashe y Hartl, 2000). Esta función está extendida entre las HSPs, pero no todas funcionan como caperonas moleculares, ni todas las caperonas moleculares pertenecen a la clase HSPs. Las caperonas interactúan con proteínas cuya conformación no es la nativa con el fin de evitar la asociación intermolecular incorrecta de cadenas polipeptídicas desplegadas que provocaría una agregación no deseada. Las caperoninas son proteínas de la familia HSP 60/TriC, cuya función es garantizar el correcto plegamiento de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas (Hendrick y col., 1993).

La superfamilia de las HSPs agrupa una serie de familias de proteínas que se clasifican según sus masas moleculares o atendiendo a sus características funcionales. De acuerdo al primer criterio se distinguen las familias de proteínas de masa molecular elevada, media y pequeña. En la tabla V se recogen algunas de las principales características de estas familias de proteínas. Con respecto a las características funcionales, las HSPs se agrupan en: 1) caperonas o familia HSP 70, que incluye las HSPs de masa molecular elevada (HSP 110 y 90), la familia HSP 70/DnaK y los cofactores HSP 40/DnaJ; 2) caperoninas, que incluye la familia HSP 60/GroEL y TriC; 3) cofactores; 4) cristalinas; y 5) ubiquitininas.

La expresión de las HSPs se regula a nivel transcripcional. En eucariotas la respuesta al choque térmico está mediada por la activación de un conjunto preexistente de factores de transcripción de choque térmico (*Heat Shock Factor*, *HSFs*), que interactúan con elementos de secuencia de los promotores de genes de respuesta al choque térmico (*Heat Shock promoter Element*, *HSE*) (Ohtsuka y Hata, 2000). Todos los HSFs tienen dos regiones muy conservadas: un dominio amino terminal de interacción con el DNA, y un dominio que media la oligomerización de los HSFs. Este último está formado por un conjunto de tres héptadas hidrofóbicas que forman una triple cremallera de leucinas. En los HSFs de los animales, existe una cuarta héptada cerca del extremo carboxilo terminal que interacciona con las otras tres a efectos de impedir la trimerización en condiciones basales.

Tabla V.- Clasificación y función de las proteínas de choque térmico.

FAMILIA	FUNCIÓN
HSPs de masa molecular elevada	
Familia HSP 100	Son dos familias (ocho subfamilias). En condiciones basales, controlan el estado oligomérico de los factores de transcripción. Con estrés, participan en la disgregación de agregados de proteínas. A temperaturas altas, colaboran con la HSP70 en la recuperación del sistema de <i>splicing</i> de mRNAs (Vogel y col., 1995).
Familia HSP 90	Proteínas diméricas que pueden interaccionar con co-caperonas diferentes (Das y col., 1998). Contienen un sitio de unión para ATP. Se asocian a F-actina y tubulina (Schlesinger y col., 1990).
HSPs de masa molecular media	
Familia HSP 70/DnaK	Son caperonas de estructura muy conservada. Unen nucleótidos, en especial ADP y ATP (Bukau y col., 1998). Se conocen 4 tipos: <ul style="list-style-type: none"> • HSP 73 (HSC 70): se sintetiza de manera constitutiva y participa en el proceso de endocitosis (Cheetham y col., 1996). • HSP 72 (HSP 70): se induce por estrés y participa en la activación de genes de choque térmico y en el procesamiento y presentación de antígenos (Manara y col., 1993). • BiP/HSP78/GRP78: se induce por glucosa. Es responsable de la supervisión del correcto plegamiento proteico antes del proceso de secreción (Melnick y col., 1995). • GRP75: presente en mitocondrias y cloroplastos; actúa con TIM44 para importar proteínas a la mitocondria (Schneider y col., 1994).
Familia HSP 60/GroEL	Son caperoninas. Se agrupan en una serie de familias con sus correspondientes factores de cooperación (co-caperonina): GroEl/GroES, en procariotas; HSP60/HSP10, en mitocondrias; Cpn60/Cpn 10, en cloroplastos; TriC, en citoplasma de eucariotas. Presentan distintos estados conformacionales dependientes de la hidrólisis de ATP y del acoplamiento o liberación de la co-caperonina. Actúan conjuntamente con las caperonas para facilitar la maduración de las proteínas (Agashe y Hartl, 2000).
Cofactores: HSP 40/DnaJ	Cofactores de la HSP 70 participan en la maduración de proteínas (Cyr y col., 1994).
HSPs de masa molecular pequeña	
HSP 27	Caperonas independientes de ATP. Diferentes isoformas por fosforilación. Se asocia con actina bloqueando su polimerización <i>in vitro</i> (Head y Goldman, 2000). Participa en la transducción de señales (MacRae, 2000).
Cristalinas	Componente fundamental del cristalino. Presente en tejidos no lenticulares. Capaces de secuestrar compuestos pro-oxidantes o de filtrar radiaciones ultravioleta. Pueden interactuar con la actina y modular el ensamblaje del citoesqueleto (Head y Goldman, 2000).
Ubiquitinas	Marcador de degradación de proteínas (Mayer y col., 1991). La glicocola carboxilo-terminal se une covalentemente a los grupos ϵ -amino de lisinas de las proteínas a degradar. El ATP aporta la energía necesaria para la formación de estos enlaces.

En humanos se conocen al menos tres familias: HSF1, HSF2 y HSF4. En estado inactivo, HSF1 se encuentra en forma monomérica tanto en el núcleo como en el citoplasma, mientras que HSF2 aparece en forma dimérica y se localiza en el citoplasma. La activación de cada uno de ellos requiere su oligomerización a un estado trimérico y su relocalización al núcleo donde se unen a los elementos de secuencia HSE (Sistonen y col., 1994). La activación de los HSFs, que involucra factores celulares entre los que se encuentran las propias HSPs 70 y 90, regulan la activación de HSFs a través de reacciones de fosforilación que facilitan la interacción específica con los HSEs. La HSP 70 también puede unirse a la forma monomérica del HSF1 estabilizando su forma inactiva (Kim y col., 1995).

1.5.2 Proteínas de choque térmico y cáncer

Las alteraciones observadas en las HSPs en los procesos tumorales pueden ser de distinta naturaleza e incluyen cambios en la expresión de HSPs concretas y/o cambios en la localización subcelular de las mismas. La localización de HSPs en la superficie de las células tumorales, en contraste con su localización intracelular normal [citoplasma, núcleo y orgánulos (retículo endoplásmico, mitocondrias y cloroplastos)], ha permitido sugerir que desempeñan un papel como antígenos tumorales o portadores de antígenos tumorales (Wells y Malkovsky, 2000). Las primeras HSPs a las que se asignó este papel pertenecen a la familia HSP 90 (Ullrich y col., 1986); se ha implicado a varios miembros de la familia HSPs 70 en distintas etapas del procesamiento y presentación de antígenos (Wells y Malkovsky, 2000).

Por otro lado, aunque se ha sugerido que la expresión de ciertas HSPs puede servir para evaluar el pronóstico en ciertos tumores, los datos son limitados. Además, los resultados son frecuentemente contradictorios ya que la expresión de las HSPs depende del estímulo, del estado fisiológico de la célula, de las características de la HSP, del tipo de tumor y del método de detección utilizado (Sun, 1997; Sarto y col., 2000). En cualquier caso, en ciertos cánceres humanos se han descrito alteraciones tanto en el patrón como en los niveles de expresión de distintas HSPs (Sarto y col., 2000). Así, a modo de ejemplo, se han detectado niveles elevados de algunos miembros de la familia HSP 90 en cánceres de mama, siendo indicativos de un mal pronóstico (Jameel y col., 1992). En carcinomas colorrectales y de mama, la expresión de HSP 70 se correlaciona con un bajo grado de diferenciación y un mal pronóstico (Lazaris y col., 1995; 1997), mientras que en carcinoma renal está asociada con un pronóstico favorable (Santarosa y col., 1997). La HSP 27 puede servir como marcador intrínseco de las células tumorales (Fuller y col., 1994). Altos niveles de HSP 27 han sido detectados en algunos cánceres de mama y de endometrio, observándose una correlación entre la sobreexpresión de esta proteína y el potencial metastásico y tumorigénico (Ciocca y col., 1993). Las HSPs 27 de células tumorales son idénticas a las de células normales excepto en sus patrones de

fosforilación. Dos isoformas, ninguna de las cuales es constitutiva y que sólo difieren en sus patrones de fosforilación, se han encontrado en el tejido linfoide de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (Têtu y col., 1992). Además, la existencia de diferentes patrones de fosforilación se ha relacionado con la resistencia o susceptibilidad a fármacos quimioterapéuticos (Ciocca y col., 1993).

Otra vía por la que las HSPs pueden influir en los procesos tumorales es su capacidad para interaccionar con los productos de los proto-oncogenes y genes supresores de tumores (Fuller y col., 1994). La HSP 70, en algunos tumores, colocaliza con c-myc y v-myc, lo que sugiere que la HSP 70 podría regular la actividad de estas proteínas manteniéndolas en una conformación inactiva. Asimismo, estas proteínas están implicadas en la regulación de la expresión de la HSP 70; en particular, c-myc puede activar el promotor del gen *hsp 70* en humanos (Kingston y col., 1984). Otro ejemplo, lo constituyen las HSPs que tienen capacidad para unirse, en células tumorales, tanto a la forma mutada como normal de la proteína p53 modulando sus efectos biológicos en la célula (Sun y col., 1997). Esta interacción no es general, y la unión de HSP a p53, mutada o no, depende tanto del tipo celular como de la mutación. Altos niveles de la proteína p53 en células de carcinoma gástrico humano se han correlacionado con altos niveles de la HSP 70, sugiriendo que estas proteínas pueden formar complejos protegiendo la conformación nativa de p53 e incrementando su vida media y su función (Goto y col., 1999).

1.5.3 Proteínas de choque térmico y apoptosis

En los tumores, los cambios en la expresión de diferentes HSPs pueden tener implicaciones en el proceso de apoptosis (Arrigo, 2000; Creagh y col., 2000). Aunque las HSPs se sintetizan durante la proliferación celular, muchos estímulos que causan muerte celular pueden también inducir su expresión. La inducción de HSPs en este contexto puede ser parte de mecanismos de defensa celular (Trump y col., 1992). La principal función de las HSPs en un ambiente de estrés es proporcionar protección a la célula. Cuando el agente estresante es eliminado, las células continúan sus funciones normales y los niveles de HSPs descienden a los basales. Sin embargo, si el estrés se incrementa, la presencia de HSPs puede no ser capaz de proteger a la célula y, entonces, el programa de apoptosis se activa. Si los niveles de estrés aumentan descontroladamente la muerte por necrosis llega a ser el principal mecanismo de muerte celular (Chien y Branemark, 1999). Hay numerosas evidencias que apuntan a que la inducción de HSPs coincide con la adquisición de tolerancia a altas dosis de estrés, el cual, de otra manera, podría ser letal para la célula (Samali y Cotter, 1996). La apoptosis inducida por hipertermia o por retirada de factores de crecimiento parece estar inhibida en células termotolerantes, sugiriendo un posible papel de las HSPs inducibles en los

mecanismos de resistencia (Samali y Cotter, 1996; Chen y col., 1999). Existen también evidencias que indican que las células transfectadas con las HSPs, o que sobreexpresan estas proteínas, llegan a ser más resistentes a los efectos citotóxicos de algunos fármacos anticancerígenos que, en otras circunstancias, inducirían apoptosis (Oeserreich y col., 1993).

El mecanismo por el que las HSPs pueden proteger a las células de la apoptosis no se conoce, pero se ha sugerido que podría estar implicada la propia función de las HSPs, de estabilización y plegamiento correcto de proteínas. La supresión de la agregación de la actina por las HSPs es de especial importancia porque la G-actina es un potente inhibidor de la DNAsa I, enzima que parece estar implicada en la fragmentación del DNA durante la apoptosis (Ucker y col., 1992). Otro efecto antiapoptótico de las HSPs puede ser la protección de la cromatina frente a ataques por proteasas y nucleasas inducidas en la apoptosis. Varios agentes estresantes pueden inducir el desplegamiento de proteínas intracelulares incluyendo las proteínas de la cromatina. Así, se ha observado que la HSP 70 se transloca al núcleo durante el estrés sirviendo como estabilizador de la estructura de la cromatina (Chen y col., 1999). Por otro lado, las HSPs pueden participar de manera directa en el proceso de apoptosis. Así, se ha descrito que la HSP 70, al igual que Bcl-2 y Bcl-X_L, puede bloquear la apoptosis inducida por una variedad de iniciadores (Samali y Orrenius, 1998). También se ha sugerido un papel para las HSPs de masa molecular pequeña interfiriendo en la apoptosis inducida por TNF y ligandos de Fas (Arrigo, 2000).

1.6 TRANSPORTE FACILITADO DE GLUCOSA

La D-glucosa es la principal fuente de energía de la mayoría de los organismos. Además de ser un excelente combustible, es un precursor extremadamente versátil capaz de transformarse en una gran cantidad de intermediarios metabólicos, que son materiales de partida necesarios para numerosas reacciones biosintéticas. Al tratarse de una molécula polar, no puede ser captada por la célula mediante difusión a través de la membrana plasmática, sino que es necesaria la actuación de transportadores específicos. En células epiteliales polarizadas del intestino delgado y en los túbulos proximales del riñón, existe un cotransportador Na⁺/glucosa dependiente de energía denominado SGLT1 (Olson y Pessin, 1996). Este transportador utiliza el gradiente electroquímico del sodio para transportar glucosa en contra de un gradiente de concentración, siendo el responsable de la captura en el intestino delgado de la glucosa y de la galactosa de la dieta, así como de la reabsorción en la nefrona de la glucosa de la orina.

A diferencia de la limitada localización tisular de los transportadores SGLT1, la familia de proteínas que median el transporte facilitado de glucosa (GLUTs) está ampliamente

distribuida (Olson y Pessin, 1996; Smith, 1999). Los GLUTs actúan como reguladores del movimiento de glucosa entre el espacio extracelular e intracelular, asegurando un suplemento constante de glucosa circulante para el metabolismo celular. Tienen una alta estereoespecificidad permitiendo un transporte bidireccional a través de un mecanismo de difusión facilitada a favor de un gradiente de concentración de glucosa. En mamíferos se conocen hasta nueve miembros de esta familia, que comparten una gran similitud de secuencia, aunque sólo cuatro de ellos se han descrito como auténticos transportadores de glucosa. El número que se les ha asignado (GLUT 1-9) hace referencia al orden cronológico de aparición en la literatura. Difieren entre ellos en la dinámica del transporte del azúcar y en su distribución tisular. En la tabla VI se recoge un resumen de las principales funciones atribuidas a cada uno de los GLUTs, así como su localización tisular.

Tabla VI.- Localización y función de los transportadores de glucosa.

NOMBRE	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
GLUT 1	Ampliamente distribuido en tejidos fetales y de adulto. Eritrocitos, células endoteliales.	Transporte basal de glucosa y aporte suplementario a células en proliferación. Transporte a través de barreras tisulares (Mueckler y col., 1985).
GLUT 2	Hepatocitos, células pancreáticas, células absortivas del intestino y del riñón.	Transportador de baja afinidad. Transporte transepitelial. Participa en el sistema de control de niveles de glucosa en sangre (Orci y col., 1989).
GLUT 3	Tejido neuronal, corazón, placenta e hígado.	Transporte basal de glucosa (alta afinidad), especialmente en zonas donde la concentración de glucosa es baja (Gould y col., 1991).
GLUT 4	Adipocitos, células de músculo esquelético y cardíacas.	Incrementa el transporte de glucosa en respuesta a insulina (Baron y col., 1988).
GLUT 5	Intestino delgado y riñón. Espermatozoides.	Absorción intestinal de fructosa (Burant y col., 1992).
GLUT 6	-	Es un pseudogén que no es expresado a nivel de proteína (Smith, 1999).
GLUT 7	Retículo endoplásmico de células hepáticas.	Forma complejos con la glucosa-6-fosfatasa. Media el flujo a través de la membrana del retículo endoplásmico (Waddell y col., 1992).
GLUT8	Testículo y, en menor cantidad, en músculo esquelético, corazón, intestino delgado y cerebro.	Su expresión en testículo humano se suprime por tratamiento con estrógenos (Doege y col., 2000).
GLUT9	Riñón, hígado y otros tejidos.	Descrito a partir de la secuencia del cDNA humano (Phay y col., 2000).

Estructuralmente, los GLUTs son glicoproteínas integrales de membrana que pertenecen a una superfamilia de proteínas implicadas en el transporte de hexosas y otros compuestos hidrocarbonados (Marger y Saier, 1993). La principal característica de estas proteínas es la presencia de 12 segmentos transmembrana en α -hélice, donde los extremos amino y carboxilo terminales se localizan intracelularmente (Bell y col., 1993). Originalmente, se propuso que los segmentos transmembrana se estructuraban de modo que daban lugar a la formación de un poro con un interior polar (Mueckler y col., 1985); estudios cinéticos posteriores mostraron que el transporte de glucosa no se ajustaba del todo a este modelo. Otros estudios sugieren que el transporte de las moléculas de hexosa al interior de la célula se lleva a cabo por unión de la molécula a la cara externa del transportador que, inmediatamente, sufre un cambio conformacional y transporta el azúcar al interior de la célula (Olson y Pessin, 1996).

En lo que respecta a la regulación de estas proteínas, los aspectos mejor conocidos son los relativos a los GLUT1 y GLUT4, por un lado porque se expresan en tejidos sensibles a insulina y, por otro, porque han sido los más estudiados. Así, los niveles del GLUT1 se modifican tras tratamiento con numerosos agentes, tales como ésteres de forbol, suero, TNF α , butirato, insulina, glucosa y por ciertos oncogenes (Liong y col., 1999; Ito y col., 2000). Distintos estudios sugieren que, si bien la glicosilación no es indispensable para la actividad transportadora de los GLUTs, ésta juega un importante papel en el mantenimiento de una conformación de gran afinidad por glucosa, y consiguientemente, incrementa la actividad transportadora (Ahmed y Berridge, 1999). Los niveles de GLUT4 están regulados por insulina; esta hormona provoca una redistribución del transportador intracelular hacia la membrana plasmática. La contracción muscular o agentes como el cAMP y los ésteres de forbol influyen también en su expresión (Mueckler, 1994). GLUT2 se induce por glucosa y, a diferencia de GLUT4, los niveles de GLUT2 disminuyen por insulina mientras que los de GLUT5 no se afectan (Mueckler, 1994).

1.6.2 Transportadores de glucosa y cáncer

La adquisición del fenotipo tumorigénico va acompañado de una transición desde un metabolismo aeróbico a uno anaeróbico (a pesar de la presencia de oxígeno) y podría estar causado por los fuertes requerimientos energéticos que presentan las células tumorales (Warburg, 1956; Dang y col., 1997). De este modo, las células tumorales exhiben un incremento en la glicolisis comparado con el de células normales. Este incremento, a su vez, se refleja en una inducción de enzimas glicolíticas y una expresión anormal de GLUTs (Smith, 1999). Estudios comparativos de cortes histológicos de tejido normal y tumoral muestran, de manera general, una fuerte sobreexpresión de GLUT1 en las células transformadas (Noguchi y col., 2000). Aunque en menor medida, GLUT3 también se sobreexpresa en numerosos tejidos

tumorales y su presencia puede ser indicativa de estados más agresivos y posteriores a la expresión de GLUT1 (Binder y col., 1997); no obstante, otros estudios indican que la expresión de GLUT3 en tejido colónico normal es similar a la del tejido transformado (Noguchi y col., 2000). En lo que se refiere a GLUT2 y GLUT5 los resultados también son contradictorios (Binder y col., 1997; Grover-McKay y col., 1998). En lo que respecta a GLUT4, éste no suele detectarse en tejido tumoral aunque recientemente se ha observado una mayor expresión de este transportador respecto a GLUT1 en tumores gástricos (Yokomori y col., 1999).

La expresión mayoritaria de GLUT1 y GLUT3 en gran número de tumores puede tener una gran importancia *in vivo*. Así, la expresión de transportadores de alta afinidad por la glucosa podría conferir una ventaja selectiva de las células malignas ya que, a pesar de tener una actividad metabólica alta, normalmente se encuentran en un ambiente con restricciones nutricionales. En este contexto, estudios llevado a cabo en cortes histológicos de la secuencia adenoma-carcinoma de colon, muestran un incremento en la expresión de GLUT1 en las etapas más tardías de la secuencia y su expresión se correlaciona con la aparición de nódulos linfáticos (Younes y col., 1996). De este modo, la sobreexpresión de GLUT1 en las etapas más avanzadas se explicaría por los mayores requerimientos energéticos de los carcinomas más agresivos. Como se ha comentado anteriormente, la N-glicosilación regula la actividad transportadora de los GLUTs y, por tanto, puede jugar un papel esencial en la carcinogénesis. Así, distintos estudios sugieren que incrementos en el grado de glicosilación de GLUT1 pueden estar implicados en la adquisición de un fenotipo tumorigénico (Ahmed y Berridge, 1999).

1.7. METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ

La integridad de la matriz extracelular se encuentra sometida a un estricto control para mantener el equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de la misma y así asegurar el buen funcionamiento de tejidos y órganos. En lo que respecta a la degradación, las células elaboran una batería de enzimas capaces de degradar los distintos componentes de la matriz tales como metaloproteinasas de matriz (MMPs) y serín-, cisteín- y aspartil-proteasas (Stetler-Stevenson, 1996; Liaw y Crawford, 1999). De entre todas ellas, las MMPs juegan un papel muy relevante en los procesos de degradación de la matriz extracelular (Stetler-Stevenson, 1996; Kugler, 1999), participando en diversos procesos fisiológicos (inflamación, desarrollo embrionario, remodelación ósea, reparación de heridas, etc.) y contribuyendo al fenotipo de numerosos estados patológicos asociados con una degradación progresiva de la matriz extracelular (osteoartritis, aterosclerosis, procesos tumorales, etc.).

1.7.1 Clasificación

Inicialmente, la denominación para cada MMP se fue asignando según su especificidad por el sustrato. A medida que el número de miembros de la familia con similar especificidad fue aumentando, se hizo necesario simplificar la nomenclatura. Para ello, Okada y col. (1986) propusieron una nomenclatura que fue actualizada por Nagase y col. (1992). De acuerdo con ella, se denominan según las siglas **MMP** (*Matrix MetalloProteinase*) seguido de un número que corresponde al orden en el que se han ido descubriendo. La clasificación y las principales características de estas proteasas se recogen en la tabla VII. Actualmente, en vertebrados se han descrito desde la MMP-1 hasta la MMP-24, sin embargo, el número no es indicativo de los distintos tipos de MMPs ya que la MMP-4, -5 y -6 estaban duplicadas y, recientemente, han sido eliminadas de esta clasificación (Nelson y col., 2000).

En general, se suelen establecer cuatro subgrupos, atendiendo a la preferencia general por el sustrato y a sus características estructurales. Estos subgrupos son: colagenasas intersticiales, gelatinasas, estromelinas y metaloproteinasas de membrana; existen otros miembros que todavía no se han incluido en ningún subgrupo.

1.7.2 Estructura de las metaloproteinasas de matriz

La mayor parte de las MMPs han sido clonadas y secuenciadas. De la comparación de las secuencias y de los estudios estructurales mediante cristalografía de rayos-X y RMN, se ha comprobado que poseen una estructura característica formada por diferentes dominios funcionales. En la figura 6 se recogen las características estructurales de estas proteínas, así como las principales diferencias entre los distintos subgrupos. Tras la eliminación del **péptido señal**, la enzima se secreta en forma latente debido a la existencia de un **propéptido** de 80 aminoácidos situado en el extremo amino terminal. La cisteína presente en esta secuencia se encuentra formando un enlace de coordinación covalente con el átomo de zinc del dominio catalítico, siendo ésta la causa principal de la inactivación (Holz y col., 1992). En el **dominio catalítico**, formado por 70 aminoácidos, destaca una secuencia altamente conservada (HEXGHXXH) que corresponde con el sitio de unión de zinc (Browner y col., 1995). Además, existe un sitio de unión de dos iones Ca^{2+} , región muy conservada e importante para el mantenimiento de la estructura. En el extremo carboxilo terminal, formado por unos 200 aminoácidos, se encuentra el denominado **dominio hemopexina**. Éste está constituido por 4 repeticiones en tándem homólogas a las existentes en la hemopexina y en la vitronectina. En la frontera de este dominio, una cisteína establece un puente disulfuro con otra cisteína cercana al carboxilo terminal, lo que le confiere una estructura característica a esta zona de la molécula.

Tabla VII.- Metaloproteinasas de matriz: principales sustratos e inhibidores.

ENZIMA	MMP	latente/ activa (kDa)	SUSTRATOS [INHIBIDORES]
COLAGENASAS			
Colagenasa intersticial	MMP-1	55/45	Colágenos I, II, III, VII, VIII, IX y gelatina. Entactina, tenascina, agrecano. MMP-2, MMP-9. [TIMP-1>TIMP-2]
Colagenasa de neutrófilos	MMP-8	75/58	Colágenos I, II, III, VII, VIII, X y gelatina. Agrecano
Colagenasa 3	MMP-13	60/48	Colágeno I. MMP-13
GELATINASAS			
Gelatinasa A	MMP-2	72/66	Colágenos I, IV, V, VII, X, XI. MMP-9. Fibronectina, laminina, agrecano, elastina. [TIMP-2>TIMP-1; TIMP-4]
Gelatinasa B	MMP-9	92/86	Colágenos IV, V, gelatina. Entactina, agrecano y elastina. [TIMP-1>TIMP-2]
ESTROMELISINAS			
Estromelisina-1 (ST1)	MMP-3	57/45	Colágenos II, III, IV, V, IX, X, X y gelatina. Fibronectina, laminina, tenascina, agrecano, elastina. MMP-1, MMP-7, MMP-9 y MMP-13. [TIMP-1>TIMP-2]
Estromelisina-2 (ST2)	MMP-10	57/44	Colágeno IV, V, gelatina. Fibronectina, agrecano y elastina MMP-1.
Estromelisina-3 (ST3)	MMP-11	51/44	2-macroglobulina
Matrilisina	MMP-7	28/19	Colágeno IV, X y gelatina. Fibronectina, laminina, tenascina, entactina, agrecano y elastina. MMP-1, MMP-2 y MMP-9.
MMPs DE MEMBRANA			
MT-MMP-1	MMP-14	66/60	Colágeno I, II, III y gelatina. Elastina, fibronectina, vitronectina y proteoglicanos. MMP-2 y MMP13. [TIMP-2, TIMP-3]
MT-MMP-2	MMP-15	72/?	Gelatina, fibronectina, tenascina. MMP-2
MT-MMP-3	MMP-16	64/52	Colágeno III, fibronectina. MMP-2
MT-MMP-4	MMP-17	?/?	MMP-2
OTRAS MMPs			
Metaloelastasa	MMP-12	54/45/22	Colágeno IV y gelatina. Fibronectina, elastina, laminina, proteoglicanos
-	MMP-18	55/?	Pseudogén
-	MMP-19	58/?	Gelatina, tenascina (débil) y agrecano
Enamelisina	MMP-20	?/?	Amelogenina
-	MMP21-24	?/?	?

Para las últimas MMPs descritas aún no se conocen parámetros moleculares ni, en algún caso, los sustratos sobre los que actúan, ya que su existencia se ha descrito a partir del cDNA correspondiente. [] Inhibidores.

(Birkedal-Hansen y col., 1993). Este dominio contribuye a determinar la especificidad por el sustrato y está implicado en la unión a los inhibidores específicos de las metaloproteinasas (Murphy y col., 1992; Sánchez-López y col., 1993). Entre los distintos subgrupos de estas enzimas existen pequeñas diferencias estructurales que se recogen en la figura 6B.

1.7.3 Regulación de las metaloproteinasas

La síntesis y la activación de las metaloproteinasas de la matriz se encuentran sometidas a un control estricto que se ejerce principalmente a tres niveles: a) a nivel transcripcional, la expresión de la enzima puede ser inducida o reprimida, b) la enzima se sintetiza bajo la forma de zimógeno por lo que se requiere una etapa de activación proteolítica, y/o c) la interacción con inhibidores específicos (TIMP: *Tissue Inhibitor Matrix metalloProteinase*) modula la actividad de estas proteasas. Tanto la síntesis de las MMPs como su activación y la expresión de los TIMPs se encuentran sujetas a una gran variedad de estímulos bioquímicos (Borden y Heller, 1997; Murphy y col., 1999).

Regulación de la expresión

En los tejidos, la expresión de la mayor parte de las MMPs es baja, siendo inducida cuando se requiere una remodelación de la matriz extracelular. Las señales reguladoras actúan fundamentalmente a nivel transcripcional aunque también existe evidencia de una modulación de la estabilidad del mRNA (Borden y Heller, 1997; Westermarck y Kähäri, 1999). Multitud de factores participan en este proceso: citoquinas, hormonas polipeptídicas y esteroídicas, productos de oncogenes y promotores tumorales, componentes de la matriz extracelular como el colágeno de tipo I o la osteonectina, etc. (Sciavolino y col., 1994; Gohji y col., 1994). El efecto de los múltiples estímulos depende del tipo célula y produce una selectiva o coordinada producción de las MMPs y de sus inhibidores. Se ha observado también que un mismo factor puede regular de forma diferente a las MMPs con una especificidad por el sustrato similar. Así, por ejemplo, la MMP-9 responde a citoquinas y a factores de crecimiento mientras que la MMP-2 sólo se induce ligeramente (Mauch y col., 1994). Estos mediadores pueden ser sintetizados por las propias células tumorales o bien éstas pueden inducir a las células del estroma a sintetizar estos factores u otras MMPs (Chaudhry y col., 1993).

Del estudio de la secuencia de los promotores de distintas MMPs se ha deducido que ciertos sitios de unión de factores de transcripción son claves en esta regulación. Así, aunque no son los únicos, tanto los factores de transcripción AP-1 como los ETS juegan un papel clave en la expresión de los genes de las distintas MMPs (Borden y Heller, 1997; Westermarck y Kähäri, 1999).

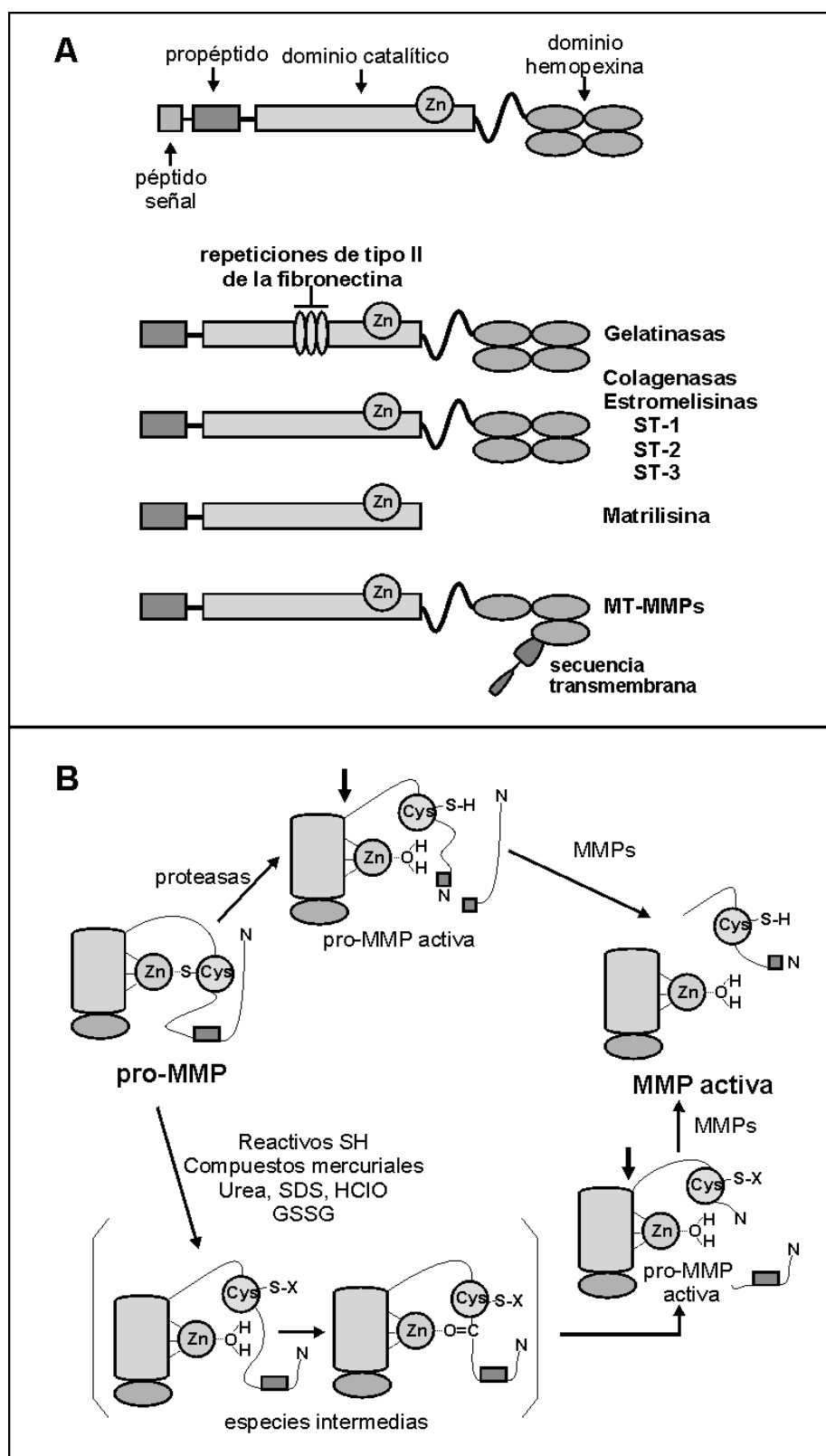


Figura 6.- Estructura de las metaloproteinasas de la matriz.

En la parte **A** de la figura se muestran los principales dominios estructurales de las MMPs y las principales diferencias entre los distintos miembros de las MMPs. En la parte **B** de la figura se recoge un esquema de los mecanismos de activación propuestos para estas enzimas.

Por otro lado, la actividad de estos factores de transcripción se regula por reacciones de fosforilación en las que participan las proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPKs), por lo que estas quinasas están implicadas en la regulación de la expresión de distintas MMPs (Westermarck y Kähäri, 1999).

Activación de la proenzima

Las MMPs se secretan siempre en forma latente y sólo se activan en el momento en que son requeridas. La activación es compleja y ocurre a través de un mecanismo en la que una cisteína actuaría a modo de interruptor (*cysteine switch mechanism*) (Murphy y col., 1999). De acuerdo a esta teoría, un residuo de cisteína del propéptido de la enzima (secuencia PRCGXPD) mantiene el estado latente de la enzima por coordinación directa con el átomo de zinc del centro activo (Figura 6B). La interrupción de esta interacción inicia una cascada de eventos que alteran la conformación de la proteína conduciendo, en último término, a la ruptura del propéptido con la consiguiente activación enzimática. Tanto si la interacción se rompe *in vivo* o *in vitro*, por tratamiento térmico o mediante el empleo de agentes específicos de grupos SH [iodoacetato, acetato 4-aminofenilmercúrico (APMA), glutatión oxidado] o inespecíficos (agentes caotrópicos, oxidantes, etc.), el proceso se produce en dos etapas (Figura 6B). En primer lugar se obtiene una forma intermedia en la que se genera el sitio de activación final que será roto tras una segunda etapa proteolítica (Nagase, 1997; Murphy y col., 1999).

Para la activación *in vivo* de estas MMPs se han propuesto cuatro mecanismos: a) activación extracelular de MMPs por otras proteasas distintas; b) activación extracelular de MMPs por otras MMPs; c) activación intracelular de MT-MMP y de estromelisina -3 por furina, y d) activación asociada a membrana de MMP-2 en la que participan la MT-MMP y el TIMP-2 (Corcoran y col., 1996; Nagase, 1997; Murphy y col., 1999).

Formación de complejos TIMP-MMP

La familia de los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs) desempeña un importante papel en el mantenimiento de los niveles de las MMPs activas. Se han descrito cuatro tipos de estos inhibidores, conocidos como los TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 (Brew y col., 2000). Los TIMPs de mamíferos son moléculas que presentan dos dominios: una región amino terminal (150 aminoácidos) y una región carboxilo terminal (65 aminoácidos), cada una de ellas estabilizada por tres puentes disulfuro (Bode y col., 1999). El alto grado de divergencia de secuencia entre los 4 TIMPs sugiere que, probablemente, difieran en propiedades funcionales. Sin embargo, aunque los diferentes TIMPs se unen fuertemente a la mayor parte de las MMPs, formando complejos de alta afinidad, no covalentes, y de estequiometría 1:1, existen ciertas diferencias en lo que respecta a su especificidad. Así, en la tabla VII se recoge

la especificidad de cada uno de estos inhibidores en el bloqueo de la actividad de las distintas MMPs. A modo de ejemplo, los TIMP-2 y TIMP-3 pero no el TIMP-1 son inhibidores efectivos de las metaloproteinasas de membrana mientras que exclusivamente el TIMP-3 inhibe a la enzima convertidora del TNF-. Por otro lado, la interacción de TIMP-1 y TIMP-2 con MMP-2 es muy diferente (Brew y col., 2000). También pueden actuar como factores de crecimiento y la presencia de TIMP-2 es esencial para la activación de la MMP-2 por MT-MMP1 (Sato y Seiki, 1996).

1.7.4 Metaloproteinasas de matriz y progresión tumoral

La matriz extracelular constituye la principal barrera para el crecimiento tumoral y los procesos de invasión y metástasis. Actualmente, existen evidencias de que los tumores malignos utilizan las MMPs para sobrepasar estas barreras. Estudios comparativos de la actividad o síntesis de las MMPs en líneas celulares procedentes de lesiones tumorales en diferentes estados de progresión permiten concluir, en general, que el incremento en la actividad o en la síntesis *de novo* de las MMPs se puede asociar principalmente con estadios avanzados de numerosos tipos de cáncer (Nelson y col., 2000; McCawley y Matrisian, 2000). Así, por ejemplo, se han encontrado líneas celulares procedentes de melanomas avanzados que son positivas para gelatinasa B (MMP-9) en un 100% de los casos (MacDougall y col., 1995). Sin embargo, líneas celulares procedentes de melanomas tempranos son negativas en la expresión de esta enzima. Un caso similar se ha observado con la matrilisina, la cual no se expresa en la mucosa normal del colon mientras que en carcinomas gástricos y de colon existe una expresión elevada de la misma (Yamamoto y col., 1994). Del mismo modo, la expresión de estromelisina 3 en carcinomas de mama se detecta en estadios avanzados (invasión y metástasis) por lo que se ha sugerido que niveles elevados de estromelisina 3 son un factor de pronóstico poco favorable para la supervivencia (Rouyer y col., 1994; Ahmad y col., 1998).

Las MMPs no sólo facilitan el paso de las células tumorales a través de las barreras tisulares degradando la matriz extracelular sino que median otros efectos. Se han descrito que pueden participar en la formación de nuevos vasos (angiogénesis), participando en la remodelación de la matriz extracelular que debe acompañar a la génesis de los nuevos capilares que irrigan al tumor en formación (Sang, 1998). Además, en la proteólisis de los componentes de la matriz extracelular se forman fragmentos que pueden tener propiedades biológicas nuevas (Giannelli y col., 1997) o liberarse factores de crecimiento que se encontraban almacenados por interacción con moléculas de la matriz extracelular (Imai y col., 1997). También pueden actuar sobre proteínas que no forman parte de la matriz extracelular (las propias MMPs, integrina 4, E-cadherina, etc.) modulando, por ejemplo, la capacidad de adhesión durante la progresión tumoral (von Bredow y col., 1997)

Muchas de las evidencias definitivas del papel de las MMPs en los procesos tumorales provienen de estudios de modulación de la expresión de TIMPs (Kähäri y Saarialho-Kere, 1999; Bode y col., 1999). De hecho, el balance entre las MMPs activadas y los TIMPs determina la actividad proteolítica total y la degradación de la matriz extracelular. Alteraciones en este balance en favor de un exceso de degradación, estaría asociada con múltiples alteraciones patológicas, entre ellas los procesos tumorales (Curran y Murray, 1999). En este contexto, en los últimos años se han diseñado y se están utilizando distintos inhibidores sintéticos de estas actividades proteolíticas para ser utilizados en terapia antitumoral (Belotti y col., 1999).

1.8 ANÁLISIS PROTEÓMICOS

En 1995 fue descifrado por primera vez el código genético completo del organismo *Haemophilus influenzae* (Fleischmann y col., 1995). Desde entonces otros genomas se han elucidado y está casi concluido el humano (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001). Sin embargo, el conocimiento integral de la Biología Molecular Celular debe continuar con la asignación de productos proteicos para cada gen componente de un genoma concreto. A partir de esta idea surge el Proyecto Proteoma, cuyo principal objetivo es la caracterización rápida de productos génicos para su asignación al gen correspondiente previamente estudiado o nuevo. El término **proteoma** apareció en la literatura en 1995 y hace referencia al “*complemento total proteico de un genoma*” (Wasinger y col., 1995). Hay que tener en cuenta que descifrar el conjunto total de proteínas codificadas por un genoma entraña serias dificultades, ya que es improbable que todo el genoma se exprese a la vez en un mismo instante. Por otro lado, las técnicas que se utilicen deben asegurar una reproducibilidad y tener la resolución y sensibilidad suficientes para detectar proteínas cuyo número de copias es bajo. Teniendo en cuenta estos hechos, el análisis proteómico va a depender del diseño experimental y será necesario examinar múltiples estados fisiológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, de tal modo que se obtenga la expresión completa del genoma de un organismo.

Dada la complejidad del sistema a estudiar, se requiere disponer de técnicas experimentales adecuadas capaces de separar con alta resolución los distintos componentes del conjunto proteico (como es el caso de la electroforesis bidimensional) y de sistemas de identificación de proteínas fiables, de alta sensibilidad y rápidos.

Electroforesis bidimensional

Los estudios proteómicos se han desarrollado asociados al perfeccionamiento de las técnicas de electroforesis bidimensional, descrita en primera instancia por O’Farrell (1975).

El fundamento de esta técnica se basa en la separación de una mezcla compleja de proteínas en función del punto isoelectrico (primera dimensión), seguido de otra separación en función de la masa molecular (segunda dimensión). En la primera dimensión se consigue una focalización isoelectrica basada en la migración de las proteínas a través de un gradiente de pH continuo hasta alcanzar el punto donde la carga neta de la proteína es cero. El gradiente de pH se genera bien por una mezcla de anfóteros que se mueven libremente en una matriz de acrilamida, o bien por inmóviles unidas covalentemente a una matriz del mismo tipo. Esta constituye la principal diferencia entre la electroforesis bidimensional tipo IEF (*IsoElectric Focusing*) y la tipo IPG (*Immobilized pH Gradients*) (Dunn y Corbett, 1996). Se ha desarrollado también la electroforesis bidimensional tipo NEPHGE (*Non Equilibrium pH Gradient Electrophoresis*) cuya utilización se restringe a la resolución de proteínas básicas (O'Farrell y col., 1977). A pesar del creciente uso de la electroforesis IPG, por la mayor reproducibilidad de las separaciones, la utilización de este método conlleva distintos problemas: precipitación de las inmóviles, pérdida de proteínas durante el proceso de equilibrado y una peor resolución debido a la alta concentración de proteínas en las zonas de focalización (Humphery-Smith y col., 1997). La separación en la segunda dimensión se realiza de acuerdo con el protocolo habitual de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Únicamente, hay que tener en cuenta que existe una relación lineal entre el tamaño del gel y el número de manchas (proteínas) que se resuelven. Por tanto, cuanto mayor sean las dimensiones del gel mejor resolución se obtiene (Humphery-Smith y col., 1997).

Detección e identificación de manchas

La eficacia de la detección de las proteínas a separar depende de la elección del agente utilizado para la tinción y de la sensibilidad del mismo. Se utilizan diversos métodos, como la tinción con azul de Coomassie, la tinción con nitrato de plata, la utilización de sondas fluorescentes, la autorradiografía, la fluorografía, etc.

El sistema de captura de la imagen obtenida tras la tinción o procesamiento del gel puede ser determinante en la obtención de los datos; para ello se han desarrollado distintos programas informáticos. Además, las imágenes computerizadas constituyen una herramienta útil para generar bases de datos que permiten comparar resultados obtenidos bajo diferentes estímulos y condiciones, o bien relacionarlas con las obtenidas por otros laboratorios. Se han creado numerosas bases de datos, entre ellas una dedicada a células de colon normal y transformado (www.ludwig.edu.au), que permite seguir las variaciones en el patrón de proteínas durante las distintas etapas de la progresión tumoral. De hecho, se han identificado distintas proteínas que podrían estar implicadas en este proceso (Reid y col., 1995) aunque el número de proteínas catalogadas es reducido en comparación con otros bancos de datos (por ejemplo, el de proteínas de *Drosophila Melanogaster*).

El análisis comparativo de las imágenes obtenidas tras el desarrollo y tinción de la electroforesis bidimensional es de gran utilidad, ya que se pueden establecer comparaciones entre la migración de una proteína desconocida con la de otra conocida. Sin embargo, son necesarias otras técnicas específicas complementarias para la identificación inequívoca de cada mancha. Se utilizan distintas técnicas como la inmunodetección, la microsecuenciación de proteínas, el análisis de aminoácidos y más recientemente, se han incluido distintos tipos de espectroscopía de masas automatizadas para la identificación de un elevado número de proteínas por día.

Utilidad de los análisis proteómicos

Enumerar las aplicaciones que hoy en día tienen los estudios del proteoma supondría la descripción de numerosos análisis que se realizan en áreas de investigación muy diversas. A modo de ejemplo, estos estudios contribuyen al conocimiento de las variaciones proteicas acontecidas durante los procesos de desarrollo de distintos organismos, los cambios ocurridos durante la proliferación y diferenciación celular, permiten la identificación de nuevas proteínas, el seguimiento de los cambios en la expresión temporal de proteínas o bajo distintos estímulos, modificaciones post-traduccionales como respuesta a determinadas condiciones ambientales, etc. (Ji y col., 1993; Mivechi y col., 1994; Santarén y García-Bellido, 1996; Rodríguez y col., 2000). Además, cabe señalar, en relación a este trabajo, que son de gran utilidad en los estudios sobre la progresión tumoral. Así, el análisis comparativo del proteoma de células tumorales con el de las correspondientes células normales permite recoger en una única imagen el conjunto de proteínas cuya expresión se induce, se reprime o se modifica durante la transformación maligna. La identificación posterior de estas proteínas puede permitir tener una visión conjunta y rápida de marcadores tumorales. De este modo, en un futuro y basándose en este análisis, podrían seleccionarse y prescribirse posibles tratamientos terapéuticos de manera individualizada. Estudios actuales con carcinomas colorrectales persiguen la identificación de posibles marcadores de la progresión tumoral. Así, de la comparación de las electroforesis bidimensionales de las proteínas de tejidos procedentes de criptas, pólipos y tejido tumoral, se han identificado distintas proteínas que podrían estar implicadas en la carcinogénesis colorrectal (Stulík y col., 1999; Cole y col., 2000; Minowa y col., 2000).

OBJETIVOS

El balance entre los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis resulta clave en el mantenimiento estructural y funcional de los distintos tejidos de un organismo, entre ellos, el epitelio del colon. Cuando estas células epiteliales escapan a la regulación de estos procesos, adquieren la capacidad de proliferar descontroladamente induciéndose la formación de tumores. Son muchos los factores implicados en la tumorigénesis, desempeñando la dieta un papel importante sobre todo en el cáncer de colon. En este contexto se puede destacar al butirato, sustrato energético para los colonocitos, que regula diversas funciones celulares y que se ha descrito como un potencial agente terapéutico y protector frente al cáncer colorrectal.

Las células BCS-TC2, establecidas a partir de un adenocarcinoma de colon humano, son de naturaleza epitelial, presentan heterogeneidad morfológica, y una tumorigenicidad prácticamente nula. Tienen un grado de diferenciación bajo, que recuerda las características del tumor primario del que derivan, presentando capacidad para diferenciarse *in vitro*. El butirato provoca alteraciones morfológicas y bioquímicas sobre estas células, que están en estrecha relación con la inducción de procesos de diferenciación y apoptosis,

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se plantean los siguientes objetivos:

El butirato, *in vivo*, controla los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis del epitelio del colon. Dado que la sensibilidad de distintos tipos de células a este agente es muy variable ***se plantea profundizar en los mecanismos de inducción de diferenciación y apoptosis ejercidos por el butirato en las células BCS-TC2.***

A pesar de los efectos anti-proliferativos del butirato, éste puede actuar como promotor del crecimiento tumoral ya que algunas células pueden escapar a su control. Por ello, ***se plantea determinar si existen células resistentes a la acción del butirato, establecerlas en cultivo y analizar su capacidad tumorigénica. Asimismo, se estudiará si la resistencia a butirato es debida a la pérdida de su capacidad para incidir sobre la diferenciación celular y/o en la de inducción del proceso de apoptosis.***

El establecimiento de células resistentes a la acción del butirato constituiría un modelo adecuado para ***estudiar las posibles alteraciones fenotípicas que pudieran dar cuenta de la inhibición de la apoptosis, así como para determinar si este bloqueo es sólo debido a los efectos de este ácido graso o a otras formas de inducir muerte celular.***

MATERIALES
Y
MÉTODOS

3.1 LÍNEAS CELULARES

Los estudios recogidos en esta Memoria se han realizado con las células BCS-TC2 procedentes de un adenocarcinoma primario de colon humano poco diferenciado (Turnay y col., 1990). Estas células, de naturaleza epitelial, crecen adheridas al soporte de cultivo y tienen una capacidad tumorigénica prácticamente nula. En los estudios con esferoides, se han utilizado también las células BCS-TC3, obtenidas a partir de las células que se desprendían de los explantes de los que se aislaron las células BCS-TC2. Presentan capacidad para crecer en suspensión formando esferoides de manera espontánea (Turnay, 1989; López de Silanes y col., 1998). Se han utilizado, además, otras sublíneas celulares derivadas de las células BCS-TC2 por selección *in vivo* con componentes de la matriz extracelular, y que difieren en su capacidad tumorigénica (López-Conejo y col, 1996; López-Conejo, 1997). Las principales características de estas células se recogen en la tabla VIII. Por otra parte, las células HT1080 proceden de un fibrosarcoma humano y presentan un fenotipo tumorigénico intrínseco (ATTC, Ref CCL 121. ATCC: *American type culture collection*; CCL: *Certified cell lines*)

Tabla VIII.- Características de las células BCS-TC2 y de las distintas sublíneas celulares.

Células	Origen	Cariotipo	Tumorigenicidad		Diferenciación
BCS-TC2	Adenocarcinoma de colon humano poco diferenciado	46XX +der(15) +der(16)	5(82)	6%	+
BCS-TC2.1	Tumores inducidos en ratones atímicos tras inyección subcutánea de células BCS-TC2 en presencia de matrigel	46XX +der(15) +der(16) +der(9)	6(8)	67%	-
BCS-TC2.2	Tumores inducidos en ratones atímicos tras inyección subcutánea de células BCS-TC2.1	46XX +der(15) +der(16) +der(9)	8(8)	100%	-
BCS-TC2.FN	Tumores inducidos en ratones atímicos tras inyección subcutánea de células BCS-TC2 con fibronectina	46XX +der(15) +der(16) +der(9)	8(8)	100%	+++
BCS-TC2.FNH	Tumores inducidos en ratones atímicos tras inyección en bazo de células BCS-TC2 con fibronectina	46XX +der(15) +der(16) +der(9)	8(8)	100%	+++

La tumorigenicidad se ensaya mediante inyección subcutánea de 10^6 células en ratones atímicos, y se expresa como incidencia total y como porcentaje. El grado de diferenciación se ha evaluado comparando el grado de polarización, mediante microscopía electrónica de transmisión, y la actividad de fosfatasa alcalina. Se asigna (+) a las células parentales, de manera que (-) indica menor y (+++) mayor grado de diferenciación.

3.2 MÉTODOS DE CULTIVO CELULAR

Todas las operaciones que se describen a continuación se han realizado en condiciones estériles y en cámara de flujo laminar vertical (BV-30/70; Telstar). El material de plástico estéril utilizado para los cultivos celulares es de la casa Costar y Sarstedt. El material de vidrio y algunas disoluciones salinas, como el tampón fosfato salino (PBS: KH_2PO_4 1,4 mM, Na_2HPO_4 7 mM, NaCl 130 mM, KCl 5 mM, pH 7,4), se esterilizan en autoclave (Presoclave 75, Selecta) a 120°C durante 20 minutos.

El medio de cultivo empleado es medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y suplementado con 4,5 g/l de glucosa y 110 mg/l de piruvato (Sigma). Para su preparación, el sólido se disuelve a una concentración de 13,53 g/l en agua ultrapura (Milli-Q, Millipore) autoclavada, adicionándose bicarbonato sódico a una concentración final 3,7 g/l. Tras su completa solubilización, el pH del medio se ajusta a 7,1. Este valor se encuentra 0,3 unidades de pH por debajo de lo deseado ya que el pH se eleva durante el proceso de filtración. El medio se esteriliza inmediatamente por filtración a través de filtros de 0,22 μm (Sartolab P Plus, Sartorius). El suero fetal bovino, la mezcla penicilina/estreptomicina (20000 U/ml y 20000 g/ml, respectivamente) y la disolución de glutamina (200 mM) son de Bio-Whittaker; la tripsina-EDTA es de Biological Industries.

3.2.1 Cultivo celular y subcultivos

Las células se cultivan de forma rutinaria en medio DMEM suplementado con un 5% (v/v) de suero fetal bovino, 50 U/ml de penicilina, 50 g/ml de estreptomicina y L-glutamina 2 mM (medio completo) y se mantienen a 37°C en una atmósfera saturada de humedad compuesta por un 95% de aire y un 5% CO_2 (incubador de CO_2 de Nuaire, modelo DH Autoflow). La metabolización del medio de cultivo se controla diariamente por observación visual del color del medio (que contiene rojo fenol como indicador de pH). El estado de la monocapa celular se examina a diario mediante microscopía de contraste de fase (microscopio de óptica invertida Nikon TMS). El medio de cultivo se cambia habitualmente cada dos o tres días en función de su grado de metabolización o del estado de las monocapas celulares. Las células se subcultivan cuando su número por superficie de crecimiento es lo suficientemente elevado o cuando las células han alcanzado la confluencia. El término confluencia hace referencia a aquellos cultivos en los cuales las células se han multiplicado hasta ocupar toda la superficie útil del soporte sobre el que están creciendo.

Para proceder al subcultivo, la capa celular se lava con PBS y las células se liberan de

la superficie de crecimiento por tripsinización con una disolución de tripsina (1:250) al 0,05% (p/v) y EDTA al 0,02% (p/v) en PBS. El cultivo celular se mantiene a 37°C, controlándose el proceso de liberación de las células de la superficie de cultivo por observación al microscopio. Cuando las células se encuentran en suspensión, se añade medio de cultivo completo con el fin de inactivar la tripsina con el inhibidor de tripsina presente en el suero fetal bovino. De esta manera, se evitan los posibles daños celulares que una exposición excesiva a la enzima podría originar.

La suspensión celular obtenida se centrifuga a 1500 rpm (centrífuga Christ Labofuge I, Heraeus) durante 5 minutos y el sedimento se resuspende en el volumen apropiado de medio de cultivo completo. Las células se siembran en nuevos frascos de cultivo para su propagación, o bien se preparan para los distintos tipos de ensayos. El recuento celular se efectúa en una cámara de Neubauer (Brand). La suspensión celular homogénea se deposita en ambas cámaras del hemocitómetro con la ayuda de una pipeta Pasteur. A continuación, se procede al recuento del número de células al microscopio calculándose, mediante las conversiones pertinentes, el número de células por mililitro de la suspensión original.

3.2.2 Conservación de los cultivos celulares

Para la conservación del cultivo celular, las células se tripsinizan al final de la fase exponencial y se recogen por centrifugación, como se ha descrito en el apartado anterior. Las células se resuspenden en medio de cultivo DMEM sin suplementos y con suero fetal bovino al 20% (v/v); posteriormente se añade dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (v/v) como agente criopreservante. La suspensión se transfiere a viales estériles de polipropileno de 2 ml de capacidad. Las suspensiones celulares se congelan disminuyendo la temperatura paulatinamente a una velocidad de 1°C/min utilizando un recipiente de plástico con alcohol isopropílico (Nalgene) para que, al depositarlo en un congelador de -80°C, la temperatura descienda a la velocidad requerida. Posteriormente, los viales se transfieren a un contenedor con nitrógeno líquido (-196°C; recipiente Locator 8, Thermolyne) donde las células se almacenan durante períodos prolongados de tiempo con una pérdida de viabilidad celular relativamente baja.

El proceso de descongelación se realiza de forma rápida sumergiendo el vial en un baño de agua a 37°C. Una vez descongelado, el contenido de los mismos se transfiere a tubos de centrífuga preparados con 10 ml de medio de cultivo completo para rebajar la concentración del DMSO, agente que puede resultar tóxico para las células. Posteriormente, las células se recogen por centrifugación y se resuspenden en medio de cultivo completo a la densidad requerida para su siembra en las correspondientes botellas o placas de cultivo.

3.2.3 Tratamiento con butirato

Para el tratamiento con butirato, se prepara una disolución stock de butirato (Sigma) 40 mM disuelto en medio DMEM completo y se esteriliza por filtración con filtros estériles de 0,22 μ m de diámetro de poro. En cada ensayo se añade el volumen adecuado de la disolución stock para alcanzar la concentración final de butirato deseada. En el tratamiento con butirato a largo plazo, las células se mantienen en presencia continuada con el agente, tripsinizando las células una vez que se alcanza la confluencia, en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Finalmente, las células se siembran de nuevo en presencia del agente a la densidad celular requerida para cada experimento.

3.2.4 Tratamiento con glucosa

Se siembran las células en placas de cultivo en medio DMEM completo. Al tiempo de proliferación adecuado, se retira el medio y se cambia por medio completo sin glucosa (Seromed) a la que se adicionan distintas cantidades de una disolución de glucosa (Merck) a 20 mM, preparada en medio DMEM sin glucosa y esterilizada a través de filtros de 0,22 μ m de diámetro de poro, hasta conseguir la concentración final requerida. Según el experimento, se adicionan también distintas cantidades de una disolución de butirato 40 mM preparada en idénticas condiciones que la glucosa hasta obtener la concentración final requerida. Terminados los distintos tiempos de incubación, se retira el medio recogiendo las células liberadas; la monocapa se lava 3 veces con PBS frío y las células se raspan y se recogen por centrifugación. El sedimento celular se resuspende en 1 ml de tampón Hepes 25 mM, pH 7,4, sacarosa 225 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 2 μ g/ml y leupeptina 1 μ M. La suspensión se pasa 10 veces por una aguja de 0.5 x 16 mm y se procede a obtener los extractos celulares, o a aislar las membranas celulares, como se recoge en el apartado correspondiente.

3.2.5 Obtención y crecimiento en esferoides

La inducción de la formación de esferoides se basa en la adaptación a un crecimiento en suspensión cuando las células se siembran sobre sustratos no adherentes. Para ello, entre 10^5 - 10^6 células se resuspenden en 15 ml de medio completo y se siembran en una placa Petri de 10 cm previamente recubierta con un lecho de 10 ml de agar (Difco) al 1% (p/v) en medio completo sin suero. Los cultivos se incuban en las condiciones habituales y, cuando se observa la formación de los esferoides, las células individuales o muertas se eliminan por repetidos cambios de medio después de sedimentar los esferoides.

Estudios de crecimiento y adhesión de los esferoides

Para evaluar el crecimiento de los esferoides, éstos se siembran individualmente en placas de 24 pocillos y se analiza la evolución de su tamaño. Los esferoides se miden usando un ocular calibrado (Olimpus) en un microscopio de óptica invertida (Nikon TMS-F). El tamaño promedio se calcula utilizando la fórmula $(a \times b)^{1/2}$ siendo a , el diámetro mayor del esferoide, y b , el diámetro perpendicular. Las medidas de los esferoides se realizan cada 2-3 días. Este ensayo permite evaluar, asimismo, la capacidad de adhesión al plástico de cultivo de los esferoides formados.

3.2.6 Estudios de hipertermia y choque térmico

En cada experimento, y previamente a ser sometidas a los diferentes estímulos, a todas las placas de cultivo se les cambia el medio de cultivo DMEM (medio completo) por medio DMEM suplementado con HEPES 20 mM atemperado previamente a la temperatura a la cual las células van a ser incubadas.

Hipertermia

Las células se trasladan desde el incubador de CO₂ de crecimiento habitual a 37°C a otro, cuya temperatura era de 42°C o 45°C, y en ausencia de CO₂. Allí se las mantiene durante 1, 2, 4, 6, 8, 10 o 24 horas. En todos los experimentos se incluye una placa control tratada del mismo modo pero incubada a 37°C.

Choque térmico

Las células reciben el mismo tratamiento descrito en el apartado anterior, pero la duración del estímulo a 42°C o 45°C es de 2 horas, transcurridas las cuales, las células se trasladan a un incubador a 37°C en ausencia de CO₂ para su recuperación durante períodos de 1, 2, 4, 6, 8 o 24 horas. En todos los experimentos se incluye una placa control a 37°C en las mismas condiciones que las empleadas para el choque térmico.

3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.3.1 Microscopía electrónica de transmisión

Las células se siembran en botellas de cultivo y se incuban hasta que alcanzan la confluencia, momento en el cual se retira el medio y se lava la capa celular con PBS. Las células se fijan *in situ* con una disolución de glutaraldehído al 2% (v/v) en PBS, durante 30-45 minutos a 4°C. Tras varios lavados con PBS, las células se recogen por raspado, se centrifugan

y se resuspenden en glucosa 0,1 M en PBS, manteniéndose en esta disolución a 4 °C durante toda la noche. A continuación, el sedimento celular se fija con tetróxido de osmio al 1% (p/v) en agua destilada durante 30 minutos a temperatura ambiente. La deshidratación de las preparaciones se lleva a cabo por tratamiento con disoluciones de etanol de concentraciones crecientes (20%-100%; v/v). Posteriormente, se realiza su inclusión en Epon 812 mediante la suspensión de las muestras en mezclas etanol:Epon con cantidades crecientes de Epon (2:1, 1:1, 1:2) y, en la última etapa, Epon al 100%, realizándose todo este proceso en la oscuridad. La última preparación se mantiene una noche a temperatura ambiente. El sedimento celular se transvasa a cápsulas, añadiendo nuevo Epon 812 al 100% hasta completar el volumen adecuado. Los bloques se forman por polimerización de la resina a 70°C durante 2-3 días. Las muestras se tallan y, posteriormente, se cortan en un microtomo con cuchilla de vidrio para obtener cortes semifinos de 1 µm de espesor. Estas secciones se tiñen con azul de toluidina y se observan al microscopio óptico para seleccionar las zonas donde se realizarán los cortes ultrafinos mediante un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung), de un grosor de 80 nm. Los cortes se colocan sobre rejillas (trama 200) tapizadas con Formvar disuelto en cloroformo al 0,16% (v/v).

Las secciones ultrafinas se contrastan con una disolución al 3% (p/v) de acetato de uranilo en etanol al 50% (v/v) durante 15 minutos. Tras lavar con agua destilada, las rejillas se dejan secar al aire y se tiñen con citrato de plomo durante 7 minutos. Las muestras se observan en un microscopio electrónico JEOL 101-O a 80 kV. El tallado de las muestras, contraste y visualización se realiza en el Centro de Microscopía Luis Bru de la Universidad Complutense de Madrid.

3.3.2 Microscopía electrónica de barrido de superficie

Para visualizar las células por microscopía electrónica de barrido de superficie, los cultivos celulares se dejan crecer hasta que las monocapas se encuentren en el estado de proliferación adecuado. En este momento, se retira el medio de cultivo y se lavan con PBS. A continuación, las células se fijan por tratamiento con glutaraldehído al 2,5% (v/v) en el mismo tampón, durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS, las preparaciones se deshidratan por tratamientos sucesivos con disoluciones de etanol cada vez más concentradas (20, 40, 60, 80 y 100%). Las muestras se terminan de secar llevándolas al punto crítico mediante un *Critical Point Dryer* (Balzers CPD 030) y se metalizan con oro en un *Sputter Coater* (Balzers SCD 004). Las preparaciones se visualizan en un microscopio de barrido de superficie JEOL JSM-6400 (Centro de Microscopía Luis Bru de la Universidad Complutense de Madrid).

3.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS GENERALES

3.4.1 Determinación de la concentración de proteína

La valoración de proteínas se realiza según el método de Bradford (1976). El reactivo contiene azul de Coomassie G-250 (Merck) al 0,01% (p/v) en etanol al 4,75% (v/v) y ácido fosfórico al 8,5% (v/v). Este método permite valorar cantidades de proteína comprendidas entre 1 y 10 μ g (100 μ l de muestra más 1 ml de reactivo), o entre 10 y 100 μ g (100 μ l de muestra más 5 ml de reactivo) determinándose la absorción a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-640. La medida de absorción se puede realizar 2 minutos después de hacer la mezcla y son estables hasta 1 hora. Las rectas de calibrado se realizan tomando albúmina de suero bovino (Fracción V, Sigma) como patrón. El cálculo de la concentración de la disolución de albúmina se realiza a partir del valor de absorbancia a 280 nm del espectro de la proteína obtenido en un espectrofotómetro DU-640 utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico, siendo el coeficiente de extinción de la albúmina de 0,66 ml mg⁻¹ cm⁻¹.

3.4.2 Obtención de extractos celulares

Para la obtención de extractos celulares, las células se tripsinizan y se lavan con PBS. El sedimento celular obtenido tras centrifugación a 1.500 rpm (centrífuga Christ Labofuge I, Heraeus) durante 10 minutos, se resuspende en el volumen adecuado de tampón de lisis [Tris 10 mM, pH 7,6, EDTA 2 mM, NaCl 140 mM, Triton X-100 al 2% (v/v), PMSF 1 mM y NEM 1 mM]. Esta suspensión celular se pasa 10 veces a través de una aguja de 0.5 x 16 mm y se centrifuga 5 minutos a 13.000 g con el fin de eliminar ácidos nucleicos y restos celulares de gran tamaño que no se hayan solubilizado. El sedimento se descarta y el sobrenadante se conserva a -20°C hasta su utilización.

En los estudios de hipertermia y choque térmico, las células se recogen por raspado utilizando como tampón de lisis Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% (v/v) y con inhibidores de proteasas y fosfatasa [ortovanadato sódico 100 μ M, NaF 1 mM, PMSF 250 μ M, aprotinina al 1% (v/v)], tras lo que se procede como en el caso anterior. La concentración de proteínas de los correspondientes extractos se determina mediante el método de Bradford.

3.4.3 Aislamiento de membranas celulares

Para la obtención de membranas celulares, se parte de una placa de 10 cm de diámetro con células en estado confluyente. La placa se lava 2 veces con PBS frío y, o bien se congela a -80°C hasta su utilización, o bien se continúa con el protocolo de aislamiento. Se despegan las células de la placa por raspado en 1 ml de tampón de homogeneización (Hepes 25 mM, pH 7,4, sacarosa 225 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 1 M, pepstatina 1 M y aprotinina 0,2 TIU/ml). El extracto se pasa 10 veces a través de una aguja de 0,5 x 16 mm para luego, posteriormente, centrifugar el homogeneizado a 4°C durante 5 minutos a 5000 rpm. El sedimento se descarta (fracción nuclear) y el sobrenadante se centrifuga a 150.000 g durante 90 minutos en una ultracentrífuga L5-65B de Beckman. El sobrenadante se descarta (fracción citosólica) y se resuspende el sedimento (fracción de membranas) en 200-300 μl de tampón Hepes 30 mM, pH 7,4. Como controles positivos se han utilizado membranas obtenidas a partir de músculo y de cerebro de rata. Se valora la concentración de proteína por el método de Bradford y las membranas celulares se conservan a -20°C hasta su utilización.

3.5 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

Preparación del gel

La polimerización de los geles de poliacrilamida y el desarrollo de la electroforesis se lleva a cabo en un sistema discontinuo de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970). Los geles se preparan utilizando un sistema de electroforesis mini-Protean II (BioRad). El gel separador se prepara a la concentración de acrilamida requerida [a partir de una disolución de acrilamida al 30% (p/v) y bisacrilamida 0,8% (p/v)], en un tampón Tris 0,4 M, pH 8,8, conteniendo dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% (p/v). La polimerización se inicia por adición de persulfato amónico al 0,045% (p/v) y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) al 0,075% (v/v), ambas concentraciones finales. Una vez polimerizado el gel separador, se procede a la preparación del gel concentrante empleándose una disolución de acrilamida al 4% (p/v) en un tampón Tris 120 mM, pH 6,8, con SDS al 0,1% (p/v), persulfato amónico al 0,03% (p/v) y TEMED al 0,2% (v/v). Esta disolución se añade sobre el gel separador y se introduce un molde para dar forma a los pocillos de aplicación.

Preparación de las muestras

Las muestras a analizar se resuspenden en tampón de aplicación constituido por Tris 62,5 mM, pH 6,8, SDS al 3% (p/v), glicerol al 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,02% (p/v) y se desnaturalizan, previamente a su aplicación, por calentamiento a 90°C durante 5 minutos en baño de bloque (Selecta). Las muestras reducidas se preparan del mismo modo pero con tampón que contiene β -mercaptoetanol al 5% (v/v).

Desarrollo de la electroforesis y detección de proteínas

Las muestras se aplican en los pocillos del gel y la electroforesis se desarrolla a temperatura ambiente en un tampón Tris 0,025 M, pH 8,3, glicocola 0,2 M, conteniendo SDS al 0,1% (p/v), manteniendo una intensidad de corriente constante de 25 mA por gel generada por una fuente de tensión Bio-Rad 1000/500, y se detiene cuando la banda de azul de bromofenol llega al final del gel. Posteriormente, los geles se tiñen sumergiéndolos durante 15 minutos en una disolución de azul de Coomassie (Brilliant Blue R-250, Merck) al 0,25% (p/v) en metanol:ácido acético:agua (5:1:5; v/v/v). El desteñido de los geles se realiza por repetidas inmersiones en una disolución de ácido acético al 7,5% (v/v) y metanol al 20% (v/v). La determinación de las masas moleculares de las proteínas se lleva a cabo empleando un patrón con proteínas (preteñidas o no) de masas moleculares conocidas (Bio-Rad).

3.5.2 Transferencia e inmunodetección (*Western blot*)

La transferencia electroforética se realiza básicamente según el procedimiento descrito por Towbin y colaboradores (1979). Tras el desarrollo de la electroforesis en las condiciones anteriormente descritas, los geles, así como las membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL; Amersham) y las láminas de papel 3MM Chr (Whatman), se dejan equilibrando durante 15 minutos en tampón de transferencia [Tris 48 mM, pH 9,5, glicocola 39 mM, SDS 0,0375% (p/v) y metanol al 20% (v/v)]. El desarrollo de la transferencia se lleva a cabo utilizando un equipo de transferencia (SV20-SDB, Sigma-Aldrich), aplicándose una intensidad de corriente de 0,8 mA/cm² de gel durante el tiempo necesario para conseguir la transferencia total de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa (normalmente 1 hora).

Finalizada la transferencia, la membrana se bloquea por incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con PBS que contiene leche deslipidizada al 5% (p/v). A continuación, se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, o bien 18 horas a 4°C, con el anticuerpo correspondiente diluido en PBS. Posteriormente, la membrana se lava exhaustivamente en PBS-Tween-20 al 0,05% (v/v). La incubación con el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo, de ratón o de rata, obtenidos en cabra y marcados con peroxidasa, se lleva a cabo durante una hora a temperatura ambiente en PBS a la dilución adecuada. Tras el lavado

en condiciones idénticas a las del primer anticuerpo, el revelado se realiza utilizando el *kit* comercial de ECL "*Enhanced chemiluminescence*" (Amersham) basado en la emisión de luz por la oxidación de luminol (una diacilhidrazida cíclica), en presencia de H₂O₂, catalizada por la peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo. La exposición de una película fotográfica (Hyperfilm-ECL; Amersham) a la membrana permite la detección de las bandas proteicas reconocidas por el anticuerpo tras el revelado de la película en una procesadora de sobremesa Curix 60 (Agfa). Los anticuerpos y las diluciones que se han utilizado, así como la procedencia de cada uno de ellos se recogen en la tabla IX.

Densitometrado y cuantificación

Para poder cuantificar es necesario verificar que se ha aplicado la misma cantidad de proteína total en todos los casos. Para ello, siempre se realiza la electroforesis de dos geles idénticos; con uno, se lleva a cabo la inmunotransferencia, mientras que el otro se tiñe con azul de Coomassie y se destiñe como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, la membrana de nitrocelulosa se divide horizontalmente para aprovechar un mismo gel y realizar la inmunodetección de dos proteínas de muy distinta masa molecular (p.e., HSP 70 y HSP 27). Asimismo, tras el análisis mediante inmunotransferencia de la proteína objeto de estudio, las membranas se reutilizan empleando anticuerpos frente a proteínas no relacionadas (-tubulina, -actina, vinculina o anexina V), con el fin de proceder a una normalización cuantitativa de las bandas de proteína. La reutilización de las membranas se lleva a cabo sumergiendo la membrana de nitrocelulosa en tampón Tris 62,5 mM, pH 6,7, SDS 2% (p/v) y -mercaptoetanol 100 mM durante 30 minutos a 50°C; su eliminación y posterior lavado con PBS (10 minutos; 3 veces) permite comenzar de nuevo el protocolo de detección con anticuerpos a partir de la saturación con leche deslipidizada.

Las películas de ECL correspondientes a las membranas de inmunotransferencia (original y reutilizada), así como los geles teñidos con azul de Coomassie, se digitalizan utilizando un sistema de fotodocumentación de UVItec (Cambridge, Reino Unido) y se densitometran utilizando el programa UVIBand V.97 de la misma compañía, que proporciona el "volumen" de las bandas de acuerdo a la intensidad de las mismas, obteniéndose los volumogramas.

3.5.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para determinar si se ha producido apoptosis, se observa si existe fragmentación en escalera del DNA genómico, según se describe en Smith y colaboradores (1989). Las células se tripsinizan (previamente se recogen o no las células desadheridas, según el experimento), se lavan dos veces en PBS, y se recogen por centrifugación a 1.500 rpm (centrífuga Christ

Tabla IX: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

ANTICUERPO Y ANTÍGENO	CARACTERÍSTICAS Y PROCEDENCIA
Anti-estromelislina3 <i>Estromelislina 3</i> (ST3) (51 kDa)	Anticuerpo monoclonal obtenido en rata (clon Mab 5ST-4A9). Antígeno: proteína ST3 recombinante sin el pro-dominio. Fluido aséptico. Dilución: 1/10.000. [Dr. Basset (IGBMC, Estrasburgo, Francia)]
Anti-Hsp27 <i>HSP 27</i> (27 kDa)	Anticuerpo monoclonal obtenido en ratón. Antígeno: HSP 24 de células MCF-7. Purificado por cromatografía de afinidad. Dilución: 1/5.000. Stressgen (SPA-800)
Anti-Hsp60 <i>HSP 60</i> (60 kDa)	Anticuerpo monoclonal (clon LK-1) obtenido en ratón. Antígeno: HSP 60 recombinante humana. Fluido aséptico. Dilución: 1/5.000. Stressgen (SPA-806)
Anti-Hsp70 <i>HSP 70</i> (72 kDa)	Anticuerpo monoclonal obtenido en ratón. Antígeno: HSP 70 de células HeLa. Purificado por intercambio iónico. Dilución: 1/5.000. Stressgen (SPA-810)
Anti-Hsc70 <i>HSC 70</i> (73 kDa)	Anticuerpo monoclonal (clon 1B5) obtenido en rata. Antígeno: HSC 70 de células CHO. Purificado por cromatografía de afinidad. Dilución: 1/5.000. Stressgen (SPA-815)
Anti-citoqueratinas <i>Citoqueratinas</i> (45-59 kDa)	Anticuerpo monoclonal obtenido en ratón (clon C-11); reconoce a 29 citoqueratinas diferentes. Antígeno: preparación enriquecida de citoqueratinas obtenidas de la línea de carcinoma epidermoide A431. Dilución: 1/4.000. Sigma (C-2931)
Anti-vimentina <i>Vimentina</i> (54 kDa)	Anticuerpo monoclonal obtenido en ratón. Antígeno: vimentina de lente de ojo porcino. Fluido aséptico. Dilución: 1/1.000. Amersham (RPN.1102)
Anti-Bcl-2 <i>Proteína Bcl-2</i> (25-26 kDa)	Anticuerpo policlonal obtenido en conejo. Antígeno: péptido localizado en el N-terminal de Bcl-2 humana. Purificado por cromatografía de afinidad. Dilución: 1/1.000. Santa Cruz (SC-492)
Anti-Bax <i>Proteína Bax</i> (21 kDa)	Anticuerpo policlonal obtenido en conejo. Antígeno: péptido localizado en el N terminal de Bax murina. Purificado por cromatografía de afinidad. Dilución: 1/1.000. Santa Cruz (SC-526)
Anti-GLUT1 <i>GLUT1</i> (43 kDa)	Anticuerpo policlonal obtenido en conejo. Antígeno: péptido sintético correspondiente a la región C-terminal del transportador de glucosa eritrocítico de cerebro (477-492). Dilución: 1/4.000. Diagnostic International (RaGLUT-1)
Anti-GLUT4 <i>GLUT4</i> (52 kDa)	Anticuerpo policlonal obtenido en conejo. Antígeno: oligopéptido correspondiente a los 15 aminoácidos del C-terminal de GLUT4. [Dr. Zorzano (Univ. Barcelona)]
Anti-p21 <i>p21</i> (21 kDa)	Anticuerpo monoclonal obtenido en ratón. Antígeno: p21 recombinante. Purificada de fluido aséptico por cromatografía. Dilución: 1/200. Neomarkers (MS-891-P1)
Anti-IgG de conejo	Obtenido en cabra. Reconoce las cadenas H y L de IgGs de conejo. Conjugado con peroxidasa. Dilución 1/3.000. BioRad (170-6515)
Anti-IgG de rata	Obtenido en cabra. Reconoce las cadenas H y L de IgGs de rata. Conjugado con peroxidasa. Pierce (31472)
Anti-IgG de ratón	Obtenido en cabra. Específico en el reconocimiento de las cadenas pesadas de IgGs de ratón. Conjugado con peroxidasa. Dilución 1/5.000. Pierce (31437X)

Labofuge I, Heraeus) durante 10 minutos. A continuación, 10^6 células se resuspenden en 100 μ l de tampón Tris-borato 45 mM, pH 8,0 conteniendo Nonidet P-40 al 0,25% (v/v) y EDTA 10 mM. Se añade RNasa A (EC 3.1.27.5; Boehringer Mannheim) libre de DNasas a una concentración final del 0,1% (p/v) y se incuba durante 1 hora en baño de bloque a 50°C. Posteriormente se añade proteinasa K (Boehringer Mannheim) a una concentración final de 1 mg/ml y se incuba durante otra hora a 50°C. La temperatura de las muestras se incrementa a 70°C y se añaden 20 μ l de la solución de muestras [EDTA 10 mM, pH 8,0, azul de bromofenol 0,25% (p/v), sacarosa 40% (p/v), agarosa de bajo punto de fusión (USB) al 1% (p/v) en agua destilada] y después de 15 minutos más a esa temperatura, se aplican 25 μ l de cada muestra por pocillo en un gel de agarosa de alto punto de fusión al 2% (p/v). Para el desarrollo de la electroforesis se utiliza un tampón Tris 40 mM, pH 8,0, acético 40 mM, EDTA 1 mM, aplicándose 40 voltios durante un mínimo de 3 horas, transcurridas las cuales el gel se tiñe con bromuro de etidio y se observa bajo luz ultravioleta. El gel se fotografía mediante un sistema de Polaroid (carrete 667 iso 3000/30).

3.5.4 Electroforesis bidimensional

Para la preparación de las muestras, se siembran 10^5 células por pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos en medio DMEM completo. A los 3 días, cuando el cultivo se encuentra subconfluente, se retira el medio y se añade DMEM completo sin metionina ni cisteína (Bio-Wittaker) y se suplementa con 200 μ Ci de una mezcla de metionina [35 S] y cisteína [35 S] (Amersham Pharmacia Biotech). Después de una incubación con el isótopo de 2 horas a 37°C en la estufa de CO₂, se retira el medio de cultivo y la monocapa se recoge por raspado y se centrifuga 5 minutos a 1.500 rpm. Se valora la incorporación del isótopo a las células utilizando un contador de centelleo Beckman LS 3801. El sobrenadante se liofiliza y se resuspende en 200 μ l de tampón de lisis (urea 9,8 M, anfolitos de pH 7-9 al 2%, NP-40 al 4% (v/v) y DTT 100 mM). Por cada gel se aplican 10^6 cpm del extracto obtenido.

La electroforesis bidimensional tipo IEF (*Isoelectric focusing*) se realiza de acuerdo al protocolo descrito por O'Farrell (1975) con algunas modificaciones (Santarén y col., 1998). La separación de proteínas en la primera dimensión se desarrolla en geles de poliacrilamida al 4% (p/v) de dimensiones 230 x 2,3 mm, que contiene anfolitos al 2% (1,6% de pH 5-7 y 0,4% de pH 3,5-10) y se le aplica un voltaje de 1.200 V durante 20 horas. La separación en la segunda dimensión se realiza en geles de poliacrilamida al 15% (24 x 24 cm) aplicando un voltaje de 15 mA durante toda la noche a temperatura ambiente. El gel se lava sucesivamente con agua y con DMSO, durante 2 horas (dos lavados); a continuación, se introduce en una disolución de 2,5-difeniloxazol (PPO) en DMSO (1:4, p/v) durante 1 hora y se lava después con agua destilada. Finalmente, los geles obtenidos se secan y se exponen a películas de autorradiografía (Kodak) durante distinto tiempo hasta la obtención de la señal adecuada. Los fluorogramas se digitalizan con una resolución de 63,5 x 63,5 μ m (400 dpi) con un escáner

GT-9500 (Epson). Los datos de cuantificación se han obtenido utilizando los valores asignados por el programa PD Quest (versión 6.2.0); para normalizar los datos entre los diferentes geles, se ha multiplicado el valor de cuantificación de cada proteína por el número obtenido al hacer la media de los factores obtenidos de la normalización de los niveles de α -actina, α -tubulina y β -tubulina entre los distintos geles.

3.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.6.1 Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina

Para la valoración de fosfatasa alcalina se sigue el protocolo propuesto por Schroy y col. (1994). Las células tripsinizadas se siembran en placas de cultivo a la densidad celular requerida en DMEM completo. Transcurrido el tiempo adecuado, el medio de cultivo se retira, se lava la monocapa con PBS y se recogen las células en 200 μ l de tampón Tris 2 mM, pH 7,2 conteniendo manitol 50 mM. La suspensión celular se pasa 10 veces a través de una aguja de 0,5 x 16 mm y se conserva a 4°C hasta su valoración. La actividad de fosfatasa alcalina se determina mediante un *kit* (Sigma), utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato. Una concentración fija de sustrato (1 ml de la solución comercial) se preincuba a 37°C durante 1 minuto en un espectrofotómetro termostatizado (DU 640, Beckman) antes de añadir 20 μ l de la muestra y medirse la absorción a 405 nm. El incremento con el tiempo de la absorbancia a 405 nm debido a la formación de p-nitrofenol es directamente proporcional a la actividad de fosfatasa alcalina, tomándose la pendiente obtenida a los 3 minutos de incubación. Como blanco se considera la absorción que genera 1 ml de la solución comercial en presencia de 20 μ l del tampón Tris/Manitol. La actividad de fosfatasa alcalina se mide en mU por miligramo de proteína total, siendo la unidad de actividad la cantidad de fosfatasa alcalina necesaria para producir 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto a 37°C.

3.6.2 Determinación de la actividad de caspasas

Para evaluar la actividad de caspasas, las células se recogen por raspado y lavado en PBS, y se lisan en tampón Tris 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, NaH_2PO_4 10 mM, Na_2HPO_4 10 mM, Nonidet P-40 al 1%, ortovanadato sódico 0,4 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 μ g/ml y leupeptina 10 μ g/ml, durante 30 minutos a 4°C. Tras ello, se centrifuga a 20.000g durante 30 minutos, recogiendo el sobrenadante y valorándose la concentración de proteína. A 20 μ g de extracto proteico se le añaden 5 volúmenes de tampón Hepes 25 mM, pH 7,5, CHAPS al 0,1% (v/v), sacarosa al 10% (p/v), DTT 10 mM y albúmina 0,1 mg/ml. A continuación, el extracto se incuba con 10 mM del sustrato fluorescente acetil-DEVD-7-amino-4-metilcumarina o acetil-LEHD-7-amino-4-metilcumarina para medir la actividad de la caspasa 3 o 9 respectivamente. Transcurrida 1 hora de incubación a 37°C,

la reacción se detiene por adición de tampón de HPLC [agua/acetonitrilo (75/25; v/v) y ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v)]. La actividad de caspasa es proporcional a la fluorescencia emitida por el sustrato una vez procesado por la caspasa. Esta fluorescencia se determina separando los distintos productos por HPLC en fase reversa (columna C18) y registrando la emisión de fluorescencia a 455 nm tras excitar a 338 nm. Se llevan a cabo también experimentos control para confirmar la linealidad de la liberación del sustrato con el tiempo y la concentración de proteína utilizada.

3.6.3 Determinación de actividad de metaloproteinasas

La presencia de actividades degradantes de componentes de la matriz extracelular se analiza en los medios condicionados obtenidos de los diferentes cultivos celulares.

Obtención de medios condicionados

Las células se siembran en frascos de 165 cm² de superficie en medio de cultivo DMEM completo. Cuando las células alcanzan un estado semiconfluyente, se retira el medio y, para eliminar los restos de suero, se lava la monocapa celular con medio de cultivo libre de suero pero conteniendo glutamina y antibióticos a las concentraciones habituales. En estas condiciones, se incuban las células durante 30 minutos a 37°C realizando 2 cambios de medio. Transcurrido este tiempo, se elimina el medio y se añaden 30 ml del mismo medio de cultivo, en presencia o en ausencia de butirato (2 ó 4 mM), incubándose a 37°C durante distintos tiempos. Finalmente, el medio condicionado se recoge y centrifuga a 1500 rpm (centrífuga ChristLabofuge I, Heraeus) durante 10 minutos para eliminar células que pudieran encontrarse en suspensión. El sobrenadante se conserva a -80°C hasta su utilización.

Los medios condicionados se concentran por filtración utilizando filtros Centriplus-10 (Amicon) con un poro promedio que excluye proteínas de masa molecular superior a 10 kDa. La concentración de proteínas se determina por el método de Bradford. Estos medios condicionados se utilizan para detectar la actividad de MMPs mediante zimogramas, o para analizar la presencia de estas enzimas mediante inmunotransferencia.

Gelatinograma

Los gelatinogramas se han realizado según el método descrito por Heussen y Dowdle (1980). Se emplean geles de poliacrilamida al 10% que contienen gelatina (Sigma) al 0,1% (p/v), en presencia de SDS al 0,1% (p/v). En cada pocillo de la electroforesis se aplican entre 5 y 40 mg de proteína procedente de los medios condicionados concentrados en presencia de 0,5 volúmenes de tampón de aplicación de muestras de electroforesis (PAGE-SDS) 3 veces concentrado. A diferencia de lo descrito con anterioridad para la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, para llevar a cabo el gelatinograma las muestras no se desnaturalizan térmicamente, y la electroforesis se lleva a cabo siempre en condiciones no reductoras para permitir la posterior renaturalización de las proteínas con actividad

gelatinolítica. Tras el desarrollo electroforético a 4°C, los geles se lavan dos veces durante 30 minutos con tampón Tris 50 mM, pH 7,4, que contiene Triton X-100 al 2,5% (p/v), con el fin de eliminar el SDS presente en el gel. Posteriormente, se realizan dos lavados sucesivos de 10 minutos cada uno con tampón Tris 50 mM, pH 7,4, y, después, el gel se incuba durante 24-72 horas a 37°C con tampón de incubación [Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 al 0,1% (p/v), NaN₃ al 0,02% (p/v)].

Los geles se tiñen con una disolución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% (p/v) en metanol:acético:agua (5:1:5; v/v/v) durante 3 horas a temperatura ambiente. El desteñido del gel se realiza por repetidas inmersiones en ácido acético al 7,5% (v/v) y metanol al 20% (v/v). Las bandas correspondientes a actividades gelatinolíticas destacan por la tinción negativa debido a la degradación de la gelatina presente en el gel.

Caseinograma

Los caseinogramas se desarrollan esencialmente de forma idéntica a los gelatinogramas, pero con la diferencia fundamental de la sustitución de la gelatina por α -caseína (Sigma) a una concentración final en el gel de 0,5 mg/ml. La electroforesis se lleva a cabo con muestras tratadas de forma similar a la descrita para el gelatinograma, así como los lavados posteriores del gel y las condiciones de incubación y de teñido.

3.7 OTRAS TÉCNICAS Y ENSAYOS

3.7.1 Ensayo de viabilidad celular por MTT

Para la valoración de la proliferación celular, y en los estudios de viabilidad celular, se siembran las células adecuadas para cada ensayo en soportes de cultivo en presencia de medio DMEM completo. Para la valoración se prepara una disolución *stock* de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) a una concentración de 5 mg/ml en PBS, esterilizándose por filtración a través de filtros de 0,22 μ m de diámetro de poro. Se añade el MTT a las células a una concentración final de 1,25 mg/ml (25 μ l de disolución *stock* por 100 μ l de medio de cultivo) y las muestras se incuban durante 3 horas en la oscuridad a 37°C, tiempo en el cual, la sal de tetrazolio es convertida por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables en un compuesto insoluble de color púrpura. Transcurrido este tiempo, se retira el medio de cultivo de los pocillos y se añade la cantidad necesaria de HCl 0,04 N en isopropanol para lisar las células y disolver el precipitado. Finalmente, se registra la absorción a 570 nm en un lector de placas Titertek Uniskan II (Cultek). Como blanco del ensayo, se utiliza un pocillo sin células sobre el que se realiza el tratamiento anteriormente descrito.

3.7.2 Citometría de flujo

Se siembra la cantidad adecuada de células en medio DMEM completo. Transcurrido el tiempo requerido para cada tratamiento, las células se tripsinizan (recogiéndose o no las células liberadas al medio de cultivo en función del ensayo a realizar) y se dejan recuperar 30 minutos a 37°C en presencia de medio DMEM completo. A continuación se centrifugan a 1.500 rpm (centrífuga Christ Labofuge I, Heraeus), se lavan con PBS y el sedimento se resuspende en tampón (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1,8 mM) a razón de 1x10⁶ células por mililitro de tampón. Alícuotas de 1x10⁶ células se incuban con la sonda correspondiente durante 15 minutos a temperatura ambiente. Previamente a la realización de las medidas, se añaden 100 μ l de yoduro de propidio al 0,005% (p/v), para discriminar entre células viables y necróticas. Como valor control se toma la fluorescencia intrínseca de las células en ausencia de sonda. Las medidas se realizan en un citómetro de flujo FACSscan (Becton-Dickinson) del Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la Universidad Complutense de Madrid.

Las sondas, así como las cantidades utilizadas, se recogen a continuación:

- Anexina V-FITC: la anexina V fue aislada y marcada con FITC en nuestro laboratorio (Turnay y col., 1995; Olmo y col., 2001). Se añaden entre 1 y 2 μ g de anexina V-FITC por cada mililitro de suspensión celular.
- DCFH (acetato de 2',7'-diclorofluoresceína; Serva): se añade 1 μ l de DCFH 10 mM por cada mililitro de suspensión celular.
- Rodamina 123 (metil éster del ácido 2-[6-amino-3-imino-3H-xanten-9-il]benzoico; Sigma): se adiciona 1 μ g de rodamina 123 por cada mililitro de suspensión celular.

3.7.3 Detección de MMP-11 por RT-PCR

Los cebadores para la MMP-11 (estromelisin-3) se han diseñado según la secuencia obtenida en el *Genbank* (código de acceso X57766), y fueron sintetizados por Amersham Corp. La amplificación del mRNA de la MMP-11 utilizando el cebador *sense* 5'TGGGGCTGCAGCACACAACAGC (hST3-s) y el cebador *antisense* 5'TGGACCGGGAACCTCACCAGGC (hST3-as) da lugar a un producto de 502 pb. La secuencia de hST3-s corresponde a los nucleótidos 671-692 del cDNA de la MMP-11, y la secuencia del cebador hST3-as corresponde a la secuencia complementaria de los nucleótidos 1151-1172.

Aislamiento del RNA

Las células se siembran en frascos de cultivo de 165 cm² en medio DMEM completo y se incuban a 37°C hasta que alcanzan una densidad celular próxima a la confluencia. Las

monocapas se lavan con PBS estéril y se raspa la superficie con una espátula de goma estéril para levantar la capa celular. Las células se recogen por centrifugación, se lavan con PBS y al sedimento celular se le añade tampón de lisis [tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM, pH 7,0, -mercaptoetanol 0,1 M y laurilsarcosinato sódico al 0,5% (p/v)] a razón de 7-7,5 ml de tampón por cada $30\text{-}50 \times 10^6$ células. La mezcla se resuspende bien mediante 10 pases a través de una aguja de 0,5 x 16 mm. A continuación, se añaden 4 ml de una solución de cloruro de cesio (CsCl 5,7 M y citrato sódico 25 mM) sobre los que se deposita el homogeneizado celular y se centrifuga a 30.000 rpm durante 18 horas a temperatura ambiente en la ultracentrífuga L5-65B (Beckman). Se elimina el sobrenadante y el sedimento, que contiene el RNA, se deja secar durante 10 minutos. Éste se disuelve en H₂O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC al 0,1% (p/v) durante 18 h y posterior autoclavado) y se centrifuga durante 1-2 minutos a 13.000 g para eliminar posibles restos de CsCl. Finalmente se transvasa el sobrenadante a un eppendorf estéril.

Para la purificación del RNA se añaden 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 4,8 junto con 2,5 volúmenes de etanol a -20°C, ambos libre de RNasas, y se mantiene en estas condiciones durante 1 hora a -20°C. Terminada la precipitación del RNA, se centrifuga a 13.000 g durante 15 minutos a 4°C y se descarta con cuidado el sobrenadante. Al RNA se le añade entre 500-1000 μ l de etanol frío (-20°C) al 70% libre de RNasas y se deja en hielo durante unos minutos. Se centrifuga de nuevo en frío a 13.000 g durante 15 minutos y se elimina el sobrenadante. El RNA seco se disuelve en H₂O-DEPC a aproximadamente 1 μ g/ μ l, y se conserva a -80°C hasta su utilización. La concentración de RNA se determina registrando el espectro de absorción ultravioleta de una dilución 1:500 de la preparación en agua destilada. Una unidad de absorción a 260 nm corresponde a una concentración de RNA de 40 ng/ μ l.

Reacción de RT-PCR

La obtención del cDNA a partir del RNA de las células se lleva a cabo con el kit “*1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)*” de Boehringer Mannheim. 20 μ l de una mezcla de 1 μ g de RNA total (previamente calentado 5 minutos a 70°C y enfriado en hielo), 0,13 μ g de oligo(dT), 20 unidades de transcriptasa inversa, 50 unidades de inhibidor de RNasas, 1 mM de cada desoxinucleótido, MgCl₂ 5 mM, 2 μ l del tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, y KCl 50 mM) y agua estéril hasta completar el volumen, se mantienen durante 10 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, la mezcla se incuba 1 hora a 42°C. La reacción se detiene por incubación a 90°C durante 5 minutos en la que se inactiva la transcriptasa inversa. Finalmente, la mezcla se conserva a 4°C hasta su utilización.

Amplificación del cDNA mediante PCR

La amplificación del cDNA se lleva a cabo con el kit “*Ampli Taq Gold*” de Perkin Elmer. Se preparan 25 μ l de la mezcla de reacción que contiene 1 μ l del producto de reacción de RT-PCR, 1,25 unidades de Taq Polimerasa, 200 μ M de cada desoxinucleótido, 10 pmol de

cada cebador, MgCl_2 1 mM, 2,5 μl del tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM) y agua estéril hasta completar el volumen. Esta mezcla se somete durante 4 minutos a 94°C en un Termociclador Gene Amp System-2400 (Perkin Elmer Corp), seguido de 35 ciclos de PCR (94°C/30 segundos, 62°C/30 segundos y 72°C/1 minuto). Finalmente se incuba a 72°C durante 5 minutos y, a continuación, se enfría en hielo. Los productos obtenidos se separan en un gel de agarosa al 1,4% (p/v) y, para visualizar las bandas, se tiñe el gel con bromuro de etidio y se expone bajo luz ultravioleta.

3.7.4 Determinación de la capacidad tumorigénica: estudios *in vivo*

Las células se recogen por centrifugación y se dejan recuperar durante una hora en medio completo a 37°C. Posteriormente se lavan con PBS y se resuspenden a la densidad celular requerida en medio DMEM libre de suero o en PBS. Estas suspensiones celulares (0,2 ml que contiene entre $0,5\text{-}1 \times 10^6$ células) se inyectan subcutáneamente en la región lumbar de ratones machos atímicos (BALBc, nu/nu; Harlan Ibérica) de 8 semanas de edad. Se mantienen en una cámara de flujo en condiciones estériles, recibiendo agua y comida *ad libitum*, y se mantienen diariamente con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (Animalario de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense).

La evolución de los posibles tumores se sigue diariamente para determinar cuándo comienzan a ser visibles los tumores y, a partir de ese momento, el tamaño del tumor se mide cada 2-3 días. El tiempo de latencia se estima como el número de días necesario para obtener tumores con 0,2-0,3 mm de diámetro. El tamaño del tumor se calcula midiendo con un calibre las dimensiones de la masa tumoral (la media de los dos diámetros del tumor). Al finalizar el experimento, los ratones se sacrifican y los tumores se extraen. Para cada dato puntual, se utilizan 4 ratones por grupo y cada experimento se realiza por duplicado.

3.7.5 Desglicosilación de membranas celulares

Una vez aisladas las membranas celulares, 40 μg de proteína se resuspenden en 15 μl de Hepes 30 mM, pH 7,4, y 40 μl de tampón [Na_3PO_4 137,5 mM, pH 6,1, EDTA 68,7 mM, -mercaptoetanol 103,1 mM, PMSF 0,13 mM, SDS al 0,06% (p/v) y N-octilglucósido al 1,37%(v/v)]. A esta suspensión se le añaden 0,2 unidades de una mezcla de endoglicosidasa F/N-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum* (Boehringer) y se incuba durante 18 horas a 37°C. La incubación se detiene por desnaturalización a 90°C durante 5 minutos. Finalmente, la muestra se procesa mediante *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-GLUT1 a una dilución 1:4.000. El revelado se realiza mediante ECL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que durante la progresión tumoral se produce una selección clonal de las células transformadas, la mayor parte de los carcinomas de colon presentan regiones que, histológicamente, son moderadamente diferenciadas (Laboisse, 1989). Por ello, las líneas celulares establecidas a partir de dichos tumores son heterogéneas y pueden contener alguna población celular con un fenotipo más diferenciado y que pueda progresar hacia la muerte por apoptosis. Distintos estudios han puesto de manifiesto que en líneas celulares de carcinoma y adenoma de colon, una pequeña proporción de células sufre apoptosis espontánea; además, ésta puede ser inducida por tratamiento con butirato. En este contexto, la línea celular BCS-TC2 se estableció a partir de un adenocarcinoma primario de colon humano. Son células de naturaleza epitelial, poco diferenciadas, morfológicamente heterogéneas y cuya tumorigenicidad es prácticamente nula (Turnay y col., 1990). Además, estas células retienen la capacidad para diferenciarse *in vitro*; el tratamiento con butirato produce alteraciones morfológicas y bioquímicas que están relacionadas con la inducción de los programas de diferenciación y apoptosis en estas células (Navarro y col., 1997).

La selección del butirato como agente inductor de diferenciación y de apoptosis se fundamenta, como ya se ha comentado, en que su presencia es imprescindible *in vivo* para el correcto mantenimiento del epitelio colorrectal, constituyendo la principal fuente de energía de los colonocitos y participando en la regulación, diferenciación y apoptosis de estas células. Así, el efecto antiproliferativo y apoptótico que ejerce sobre numerosas líneas celulares tumorales ha estimulado su estudio como un potencial agente antitumoral. Sin embargo, hay que tener cierta cautela, puesto que estudios previos sugieren que el butirato induce una menor inhibición de la proliferación en células de carcinoma que en células de adenoma (Berry y Paraskeva, 1988; Williams y col., 1990). Por otro lado, si el butirato es importante en el control de la proliferación y diferenciación del epitelio del colon, es posible que alguna célula, *in vivo*, pueda escapar a este control y comience a proliferar de manera descontrolada. En estas circunstancias, el butirato actuaría como promotor del crecimiento tumoral, ya que permitiría la expansión de los clones de células con fenotipo alterado. La existencia de líneas celulares resistentes a los efectos antiproliferativos y apoptóticos del butirato parece que sustenta esta hipótesis (Hague y col., 1995; Wakabayashi y col., 2000). Todo ello hace que la identificación de los mecanismos responsables de la resistencia a butirato tenga una gran importancia ya que podría proporcionar nuevos marcadores de la transformación maligna de adenomas colorrectales, así como posibles dianas para el establecimiento de estrategias terapéuticas diferentes contra el cáncer colorrectal.

4.1 OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS BCS-TC2.BR2

Dado el carácter heterogéneo puesto de manifiesto por las células BCS-TC2 y la existencia en las mismas de subpoblaciones con diferente capacidad tumorigénica (Turnay y col., 1990; López-Conejo y col., 1996) se planteó analizar si existe una subpoblación celular resistente a los efectos ejercidos por el butirato. Para ello, las células BCS-TC2 se han propagado y mantenido continuamente en medio de cultivo en presencia de butirato 2 mM, y se han analizado tanto los cambios morfológicos como la inducción de apoptosis.

En la figura 7 se muestra el aspecto de los cultivos de las células BCS-TC2 durante el tratamiento continuado con butirato 2 mM. Estas células son morfológicamente heterogéneas y crecen formando monocapas así como multicapas (Figura 7A). La presencia de butirato en el medio de cultivo de estas células provoca una disminución de la velocidad de proliferación celular y cambios en su comportamiento. A tiempos cortos de tratamiento (Figura 7B) se comienza a observar la liberación de células de la monocapa y una alteración en la viabilidad celular. Posteriormente, a 10 días, se aprecia claramente un deterioro del cultivo, con aumento del tamaño celular, incremento en la vacuolización, presencia de células multinucleadas, gran liberación de células al medio de cultivo y fuerte pérdida de la viabilidad celular (Figura 7C). Todas estas alteraciones coinciden con las observadas anteriormente cuando este tipo de células se trata con butirato (Navarro y col., 1997), así como en otras líneas celulares tumorales (Saito y col., 1998; Kitazono y col., 1999). Tras cuidadosos y repetidos cambios de medio de cultivo, siempre en presencia de butirato 2 mM, el número de células liberadas al medio comienza a disminuir. Así, a un mes de tratamiento se observa de nuevo proliferación celular y recuperación de la viabilidad. A este tiempo es posible apreciar claramente la existencia de dos poblaciones celulares: células de gran tamaño junto con células más pequeñas que las células BCS-TC2 (Figura 7D).

Cuando este cultivo alcanza la confluencia, las células se subcultivan, separándolas del sustrato por tratamiento con tripsina, volviéndose a sembrar en presencia de butirato; la capacidad de adhesión de las células no se modifica. Tras diversos subcultivos con tripsina, y después de 2 meses de iniciado el tratamiento, la morfología, el comportamiento celular y la velocidad de proliferación se estabilizan, momento a partir del cual se considera establecida la línea celular **BCS-TC2.BR2** (Figura 7E).

La inhibición de la proliferación, así como la liberación de células al medio de cultivo tras tratamiento con butirato se consideran como signos de inducción de apoptosis en numerosas líneas celulares (Saito y col., 1998; Kamitani y col., 1998), entre ellas las células BCS-TC2 (Navarro y col., 1997).

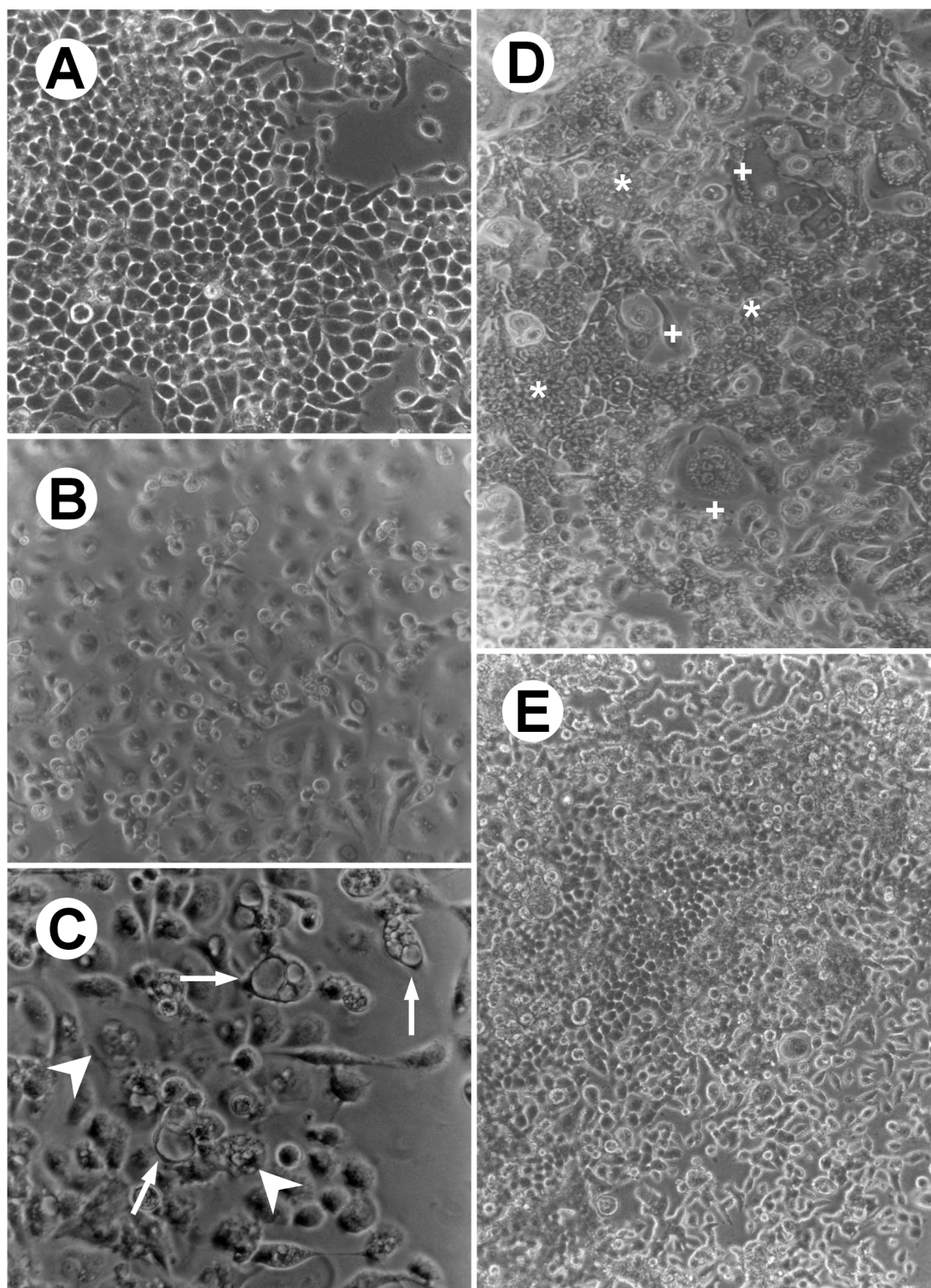


Figura 7.- Obtención de las células resistentes a butirato sódico 2 mM (células BCS-TC2.BR2).

Se siembran 7×10^5 células BCS-TC2, en frascos de cultivo de 75 cm^2 de superficie, en medio DMEM completo. Dos días después de la siembra, cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial, se cambia el medio y se añade medio fresco que contiene butirato 2mM. El aspecto del cultivo celular en ausencia (A) y presencia de butirato durante 2 días (B), 10 días (C), 1 mes (D) y 2 meses (E) se sigue a través del microscopio óptico. Los símbolos señalan detalles de algunos de los cambios morfológicos observados: aumento del volumen celular (<), mayor vacuolización (flechas), células de gran tamaño (+) junto con células de pequeño tamaño (*). Las fotografías se han obtenido a 20 aumentos.

Para analizar en profundidad este proceso, durante distintas etapas del establecimiento de las células BCS-TC2.BR2 se recogieron células con el fin de evaluar, mediante distintas técnicas, la inducción del proceso de apoptosis.

Dos de los fenómenos que se inducen durante el proceso de apoptosis son la fragmentación del DNA y la translocación de la fosfatidilserina (PS) de la membrana plasmática desde la cara interna hacia la cara externa. La degradación internucleosomal del DNA en múltiplos de 180 a 200 pares de bases es debida a la activación de endonucleasas específicas que rompen el DNA entre nucleosomas. La electroforesis en geles de agarosa del DNA de células apoptóticas permite visualizar la disposición característica en escalera de estos fragmentos (Wyllie, 1980). En segundo lugar, la translocación de PS hacia al exterior celular parece que facilita el reconocimiento fagocítico de las células apoptóticas (Motyl, 1999). Esta externalización de la PS puede ser detectada y cuantificada mediante citometría de flujo empleando anexina V marcada con un agente fluorescente, puesto que esta proteína se une a PS con una gran afinidad. Los resultados obtenidos, utilizando ambos tipos de técnicas, se recogen en las figuras 8 y 9, respectivamente.

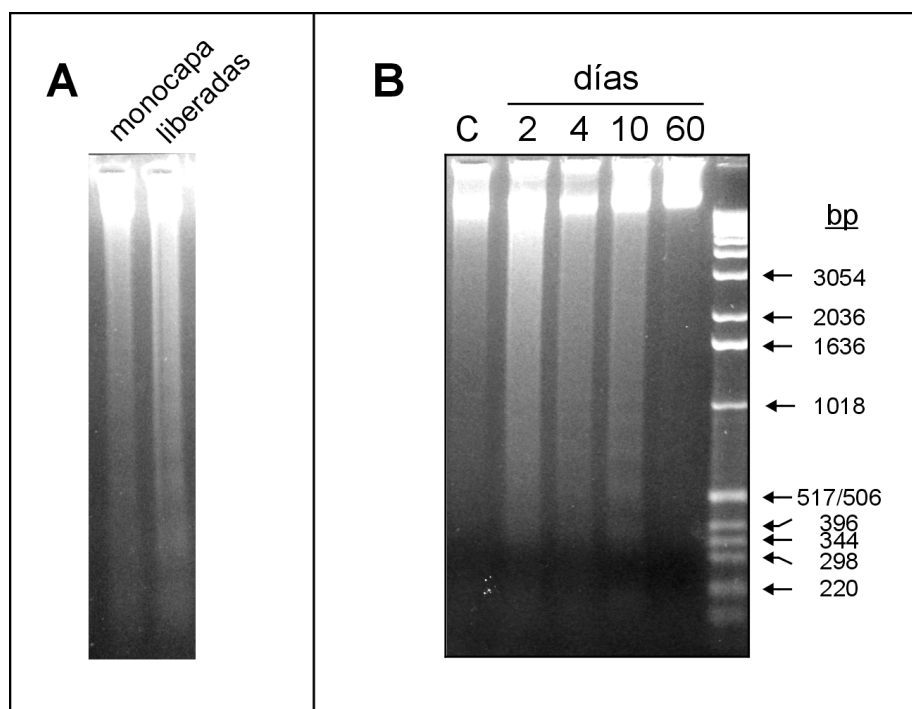


Figura 8 .- Fragmentación del DNA en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 tratadas con butirato.

Se siembran 5×10^5 células, en frascos de cultivo de 75 cm^2 de superficie, en medio DMEM completo. Al cabo de cuatro días, cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial, se cambia el medio y se añade medio fresco con butirato 2 mM. (A) Tras dos días de tratamiento se recogen las células liberadas al medio de cultivo y las monocapas se lavan con PBS y se recogen por raspado de la superficie de cultivo. (B) Células sin tratar (C) y tratadas con butirato 2 mM durante 2, 4, 10 y 60 días. Las células, una vez lavadas con PBS, se recogen por centrifugación. A continuación, las muestras se procesan para la obtención del DNA genómico, como se indica en Materiales y Métodos, y se analizan mediante electroforesis en geles de agarosa.

Un primer aspecto a comentar es que, efectivamente, el aumento de células en el medio de cultivo se debe a un proceso apoptótico. Así, tras 2 días de tratamiento con butirato 2 mM, al analizar el estado del DNA de las células liberadas al medio de cultivo se detecta fragmentación nucleosomal, mientras que no se aprecia en las células que permanecen en la monocapa (Figura 8A). Estos resultados estarían de acuerdo con el postulado de que es necesaria la pérdida de interacciones célula-sustrato para inducir apoptosis (Hall y col., 1994; Williams y col., 1996). De hecho, una de las características iniciales de las células de colon que sufren apoptosis es la desadhesión o separación de la matriz extracelular, siendo este fenómeno bastante similar al que ocurre en el epitelio colónico *in vivo*. Este tipo de apoptosis, en que la pérdida de adhesión induce muerte celular, es conocido como *anoikis* (Shanmngathasan y Jothy, 2000). Sin embargo, prácticamente no se conoce nada acerca de cómo el butirato podría inducir la apoptosis distorsionando las interacciones entre los colonocitos y la matriz extracelular. Por otro lado, estudios previos del grupo con las células BCS-TC2 indican que tienen poca o nula tendencia a sufrir *anoikis*, pudiendo crecer en suspensión sin que se detecte la inducción de apoptosis. Esto indicaría que posiblemente la desadhesión es una consecuencia, y no la causa, de la inducción de apoptosis.

Esto se confirma con los resultados obtenidos puesto que, al incrementar el tiempo de tratamiento, se puede apreciar la fragmentación del DNA en las células que permanecen adheridas, aunque la proporción respecto al DNA total no es elevada (Figura 8B). Se observa una variación dependiente del tiempo de tratamiento. Inicialmente aumenta con el tiempo de exposición al agente, comenzando a disminuir cuando se detecta un menor número de células desadheridas y empieza a recuperarse la viabilidad celular. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los estudios de citometría de flujo empleando un doble marcaje con anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) para descartar las células necróticas (IP positivas) de las células apoptóticas (anexina V-FITC positivas). En la figura 9A se muestra el diagrama de las células BCS-TC2 sin tratar. Como se puede apreciar, existe un pequeño porcentaje de células apoptóticas (12%), siendo este valor comparable al observado en otras células de adenocarcinoma de colon en cultivo. Este porcentaje se incrementa de manera considerable al tratar las células con butirato: 29% a los 2 días de tratamiento y 54% a los 10 días (Figura 9 B y C). Estos resultados confirman que una población significativa de las células adheridas muestran signos tempranos de apoptosis como se ha observado también en otro tipo de células (Fan y col., 1999). Finalmente, en las muestras obtenidas a los 2 meses de tratamiento (células BCS-TC2.BR2), no se aprecian signos de fragmentación del DNA, como ocurre en el caso de las células BCS-TC2 sin tratar (Figura 8B). El porcentaje de células apoptóticas en este caso es del 13%, de acuerdo a su marcaje con anexina V-FITC (Figura 9D), similar al que presentan las células BCS-TC2 control.

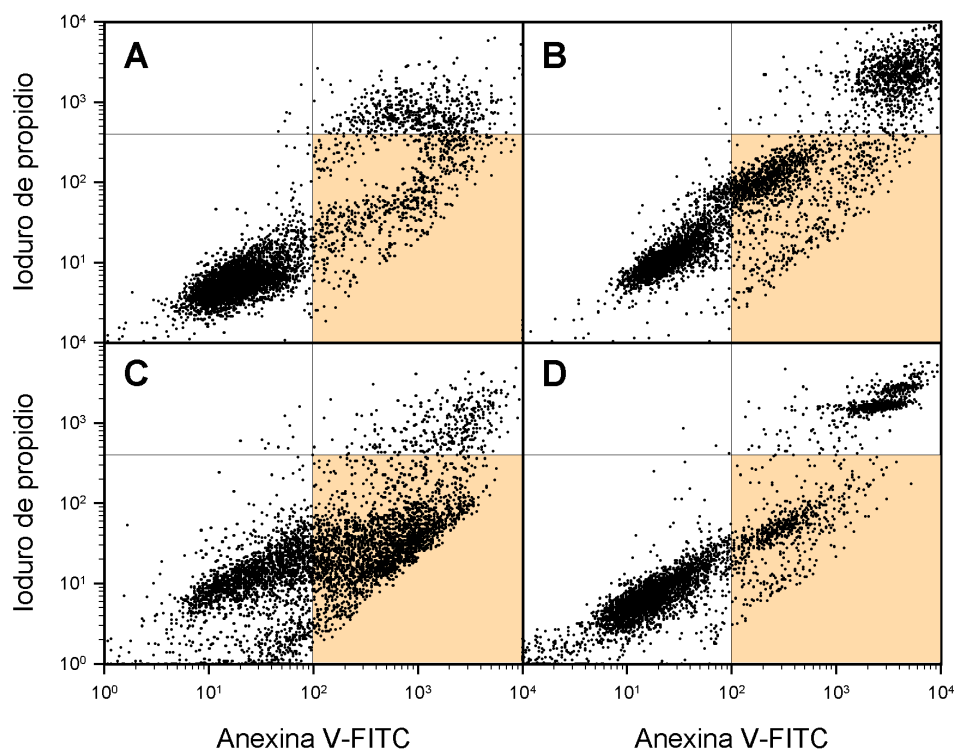


Figura 9.-Externalización de la fosfatidilserina durante el establecimiento de las células BCS-TC2.BR2 . Se siembran 10^6 células, en placas de 75 cm^2 de superficie, en medio DMEM completo. A los dos días se cambia el medio y se añade medio fresco en ausencia (A) o en presencia de butirato sódico 2 mM, incubándose en estas condiciones durante 2 días (B), 10 días (C) y 2 meses (D). Transcurrido este tiempo, las células se tripsinizan, se lavan con PBS, resuspendiéndose en el tampón adecuado. Se preparan alícuotas de 5×10^5 células en 0.5 ml de tampón y se añade anexina V-FITC, procesándose como se indica en Materiales y Métodos. El cuadrante inferior derecho representa la población celular considerada como apoptótica o anexina V-FITC positiva.

4.1.1 Apoptosis inducida por butirato y actividad mitocondrial

Durante el proceso de apoptosis se producen cambios en la mitocondria que conllevan una dispersión/disminución del potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) (Vayssière y col., 1994; Bedner y col., 1999). La rodamina 123 (Rd123) es una sonda lipofílica que se reparte a lo largo de la membrana interna de la mitocondria en función de la carga. La especificidad de la captura de esta sonda y su retención en la mitocondria se correlacionan con el potencial presente en la membrana mitocondrial. Por tanto, durante el proceso de apoptosis su captura o permanencia disminuirá.

Durante el establecimiento de las células BCS-TC2.BR2 se siguieron las variaciones en el ψ_m mediante citometría de flujo utilizando el marcaje con la sonda Rd123 y con el ioduro de propidio. Este tipo de marcaje se ha propuesto que permite discriminar entre células vivas,

que se tiñen sólo con Rd123, células muriéndose o muertas, donde la integridad de la membrana plasmática se ve comprometida (necrosis, apoptosis tardía y células con membranas dañadas) lo que permite un marcaje interno con IP, y células apoptóticas tempranas, que se tiñen con IP y con Rd123 (Bedner y col., 1999). Los resultados obtenidos se recogen en la figura 10. Como se puede apreciar de la comparación de los diagramas (Figura 10 A, B y C), la adición de butirato provoca un desplazamiento de la población celular hacia zonas con menor fluorescencia de Rd123, siendo este efecto dependiente del tiempo de cultivo en presencia del agente.

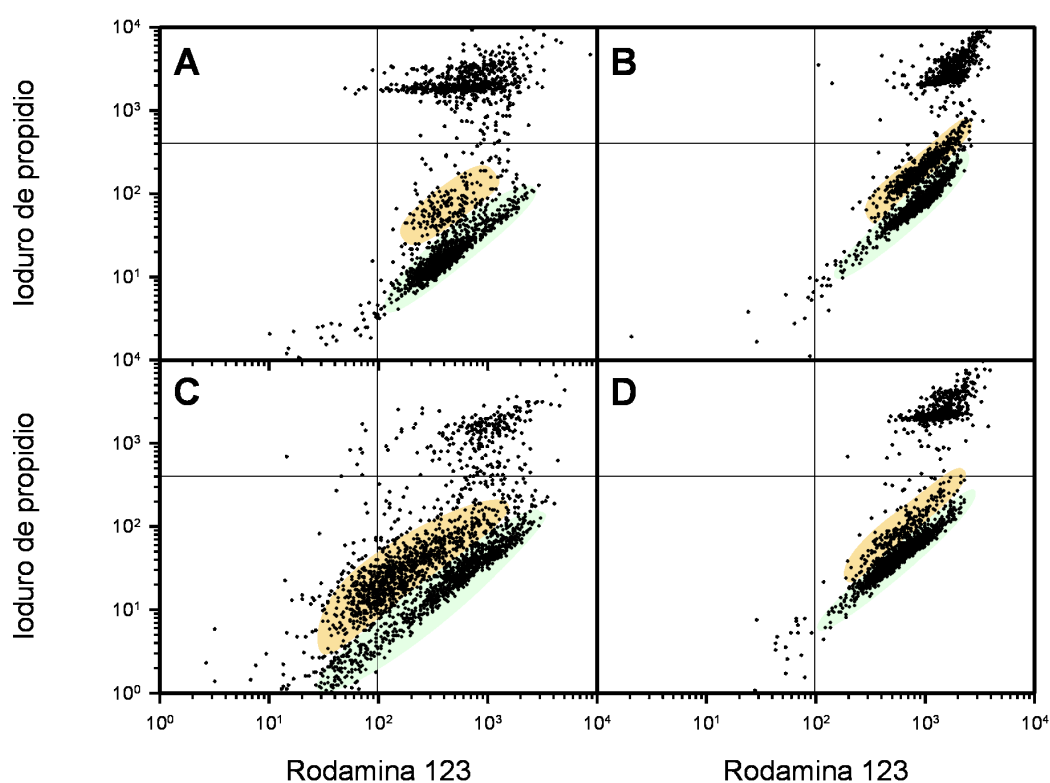


Figura 10.- Efecto del butirato en el potencial de membrana mitocondrial de las células BCS-TC2.

Las células sembradas y tratadas como se indica en la figura 7 se cultivan en ausencia (A) y en presencia de butirato 2 mM durante 2 días (B), 10 días (C) y 2 meses (D), se recogen, se lavan en PBS y se resuspenden en el tampón adecuado. Alícuotas de 5×10^5 células en 0.5 ml de tampón se incuban con Rd123, como se indica en Materiales y Métodos.

A los 10 días de tratamiento se aprecia la existencia de dos poblaciones celulares, sombreadas en naranja y verde, presentando la primera una menor incorporación de Rd123. Para justificar este hecho es posible plantear dos posibilidades. Por un lado, al inducir apoptosis, el butirato podría afectar la actividad mitocondrial desplazándose la población celular hacia zonas de menor fluorescencia. Sin embargo, también se ha descrito que la

capacidad para unir Rd123 es, en cierta medida, una característica intrínseca de las células (Summerhayes y col., 1982; Chen y Rivers, 1990). De hecho, en células tumorales, la retención de la sonda es mucho mayor que en células del mismo tipo no transformadas. Así, por ejemplo, al incubar durante 10 minutos con Rd123 cultivos de explantes primarios de epitelio colónico humano normal y de adenocarcinoma de colon, y mantener el cultivo durante 24 horas con medio fresco, sólo se aprecia fluorescencia en los explantes de adenocarcinoma (Chen y Rivers, 1990). De acuerdo con esto, puesto que a este tiempo de tratamiento coexisten dos poblaciones (resistente y no resistente; Figura 7C) podría ocurrir que la población resistente tuviera un potencial de membrana inferior al de las células BCS-TC2. Por tanto, el enriquecimiento en el número de células en la población con menor potencial puede ser consecuencia de que se están seleccionando estas células y no un efecto directo del butirato sobre el potencial de membrana. Esta segunda posibilidad no parece ser la correcta en este caso puesto que, al observar el diagrama de las células BCS-TC2.BR2 (Figura 10D) se pone de manifiesto que estas células tienen un potencial de membrana mitocondrial comparable al de las células parentales BCS-TC2 (Figura 10A). Por tanto, de estos estudios parece deducirse que, al inducir apoptosis en estas células, el butirato sódico afecta a la actividad mitocondrial. Estos resultados están de acuerdo con los descritos en otros sistemas celulares, en los que se ha descrito que el efecto ejercido por el butirato requiere que las células tengan un potencial de membrana intacto y que el proceso de disipación del mismo es esencial para iniciar la cascada apoptótica inducida por este agente (Fan y col., 1999; Heerdt y col., 1997, 1998, 1999). Por otro lado, también se puede deducir que diferencias en el potencial de membrana no serían las responsables del distinto efecto ejercido por el agente en ambos tipos de células.

Uno de los múltiples procesos que se encuentran alterados al desencadenarse la apoptosis en las células es la sobreproducción de radicales libres de oxígeno (Matés y Sánchez-Jiménez, 2000). En este sentido, la mitocondria es la mayor fuente de aniones superóxido; durante la reducción del oxígeno molecular a agua se estima que, entre un 1 y un 5% de los electrones se desvían de esta ruta generando superóxido (Green y Reed, 1998). Cualquier evento que disminuya la eficacia de acoplamiento en la cadena de transporte electrónico puede incrementar la producción de superóxido, pudiendo detectarse este incremento mediante el empleo de la sonda fluorescente: diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH; Giardina y col., 1998). La DCFH es una sonda no cargada que se introduce libremente en el interior de la célula. Una vez dentro, los grupos acetato son eliminados por esterasas no específicas generando una molécula cargada que queda atrapada en el interior celular. La presencia de radicales libres de oxígeno provoca la oxidación de la sonda, dando lugar a un compuesto que emite una fluorescencia intensa a 525 nm.

Para verificar si la inducción de apoptosis por butirato modifica la actividad mitocondrial y altera la producción de radicales libres de oxígeno, se ha evaluado la posible generación de estos radicales libres durante el establecimiento de las células BCS-TC2.BR2 utilizando la sonda DCFH. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 11.

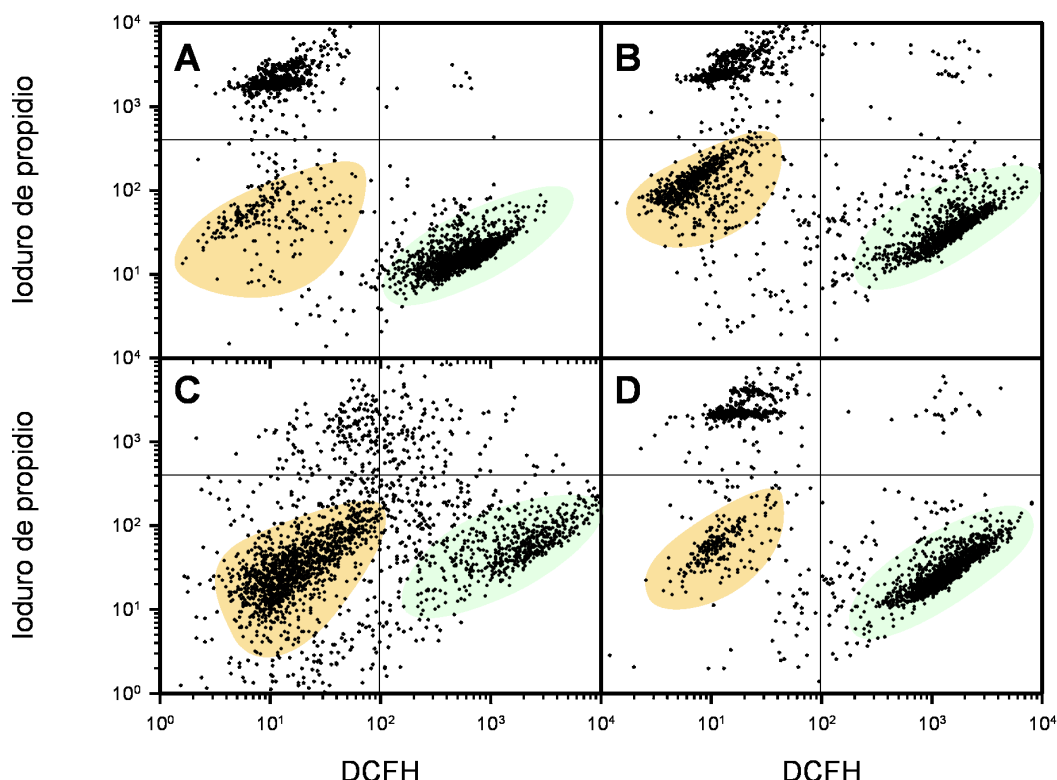


Figura 11.- Efecto del butirato en la formación de radicales libres de oxígeno en las células BCS-TC2.

Las células, cultivadas como se indica en la figura 7, en ausencia (A) y en presencia de butirato 2mM durante 2 días (B), 10 días (C) y 2 meses (D), se recogen, se lavan con PBS y se resuspenden en el tampón adecuado. Alícuotas de 5×10^5 células, en 0.5 ml de tampón, se incuban con DCFH, procesándose como se indica en Materiales y Métodos.

En el diagrama correspondiente a las células BCS-TC2 sin tratar con butirato (Figura 11A) aparecen 2 poblaciones celulares (sombreadas en naranja y verde), siendo mayoritaria la que corresponde a una mayor producción de radicales libres de oxígeno (población en verde). Como se puede observar, el tratamiento con butirato incrementa la población celular con menor fluorescencia debida a DCFH, oxidada, pasando de un 13% en las células sin tratar a un 30 y un 64%, después de 2 y 10 días de tratamiento, respectivamente. Esta población podría reflejar el incremento en células apoptóticas o en células resistentes. Con el fin de discriminar entre ambas posibilidades se llevó a cabo un estudio en el que se han analizado

las células liberadas al medio como consecuencia del tratamiento con butirato. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 12 A y ponen de manifiesto que las células apoptóticas aparecerían en la población de menor fluorescencia. Este resultado se verifica puesto que en las células tratadas con butirato durante 2 meses, células BCS-TC2.BR2 (figura 11D), se observa un perfil o distribución de fluorescencia similar al que presentan las células BCS-TC2.

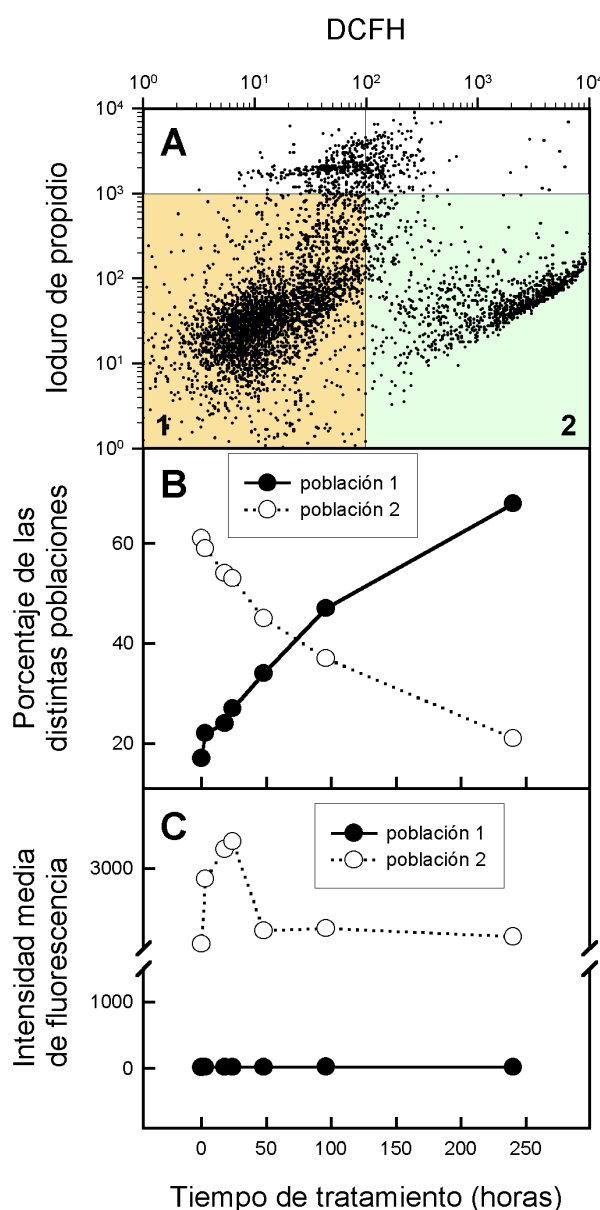


Figura 12.- Formación de radicales libres de oxígeno en las células liberadas al medio y en la población celular total de células BCS-TC2 tras tratamiento con butirato.

Se siembran 10^6 células en placas de cultivo de 10 cm de diámetro, en medio DMEM completo. (A) Las células liberadas al medio de cultivo por el tratamiento durante 4 días con butirato 2 mM se recogen y procesan según se indica en la figura 11. (B y C) En muestras correspondientes al conjunto de células (monocapa y liberadas) tratadas con butirato 2 mM, durante distintos tiempos, como se indica en la figura 11, se valora el porcentaje de células en las poblaciones 1 y 2 (menor y mayor oxidación de DCFH, respectivamente) y la variación de la intensidad media de fluorescencia de ambas poblaciones.

La modificación observada en la producción de radicales libres parece estar en desacuerdo con lo observado en otros sistemas donde se está produciendo apoptosis, ya que se ha descrito que la formación de radicales libres de oxígeno suele elevarse (mayor fluorescencia de DCFH). Sin embargo, esta producción de especies reactivas de oxígeno suele ser causa de apoptosis o incrementarse en las etapas iniciales de este proceso, disminuyendo en las etapas más avanzadas, cuando la célula está más dañada (Giardina e Inan, 1998). Esto podría explicar el incremento en la población celular de menor actividad de radicales libres de oxígeno, pudiendo tratarse de células en etapas tardías de apoptosis. Para confirmar este hecho se han determinado los niveles de radicales libres en la población celular total (adheridas y liberadas) a distintos tiempos de tratamiento. Puesto que se detectaban dos poblaciones, relacionadas con una oxidación de DCFH diferente (Figura 11) se ha procedido a cuantificar tanto el porcentaje de células presentes en cada una de las poblaciones como la intensidad media de fluorescencia de cada una de ellas. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 12 B y C. Como se puede apreciar, la disminución de la población con una fluorescencia alta para DCFH tiene lugar ya a tiempos muy cortos de tratamiento, con el consiguiente aumento en la otra población. Sin embargo, en la figura 12 C se puede apreciar que la intensidad media de fluorescencia de la población 2 (alto DCFH) aumenta a tiempos cortos de tratamiento, disminuyendo después de 24 horas hasta valores similares a los de la población inicial y permaneciendo constante después de 48 horas. Este aumento inicial en la producción de especies reactivas de oxígeno en la población celular mayoritaria (Figura 12B, tiempo 0) estaría de acuerdo con los datos descritos en el sentido de que el tratamiento con butirato incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno (Giardina y Inan, 1998; Giardina y col., 1999).

Se ha descrito que, en determinadas circunstancias, las células no se afectan por el butirato (Fagot y col., 1994; Tsujii y col., 1995). Asimismo, distintos estudios sugieren y utilizan el término de “células resistentes a butirato” por comparación con otras líneas celulares del mismo origen en las que los efectos del butirato son más acusados, habiéndose postulado que estas células resistentes deben haber desarrollado mecanismos que las protegerían frente a la inducción de apoptosis (Hague y col., 1995; Wakabayashi y col., 2000; Cahi, y col., 2000). Sin embargo, únicamente se han descrito tres líneas celulares de adenocarcinoma de colon obtenidas por selección con butirato. Además, los protocolos de selección son muy variables. Así, en 1984, Augeron y Laboisie consiguieron seleccionar una línea celular diferenciada a partir de células HT-29 poco diferenciadas. Para ello trataron las células HT-29 con butirato 5 mM durante 9 días. Trascurrido este tiempo, tripsinizaron las células y las resembraron de nuevo en presencia del agente, manteniéndolas en estas condiciones durante 14 días. Durante esta segunda fase observaron multinucleación, que desapareció con la retirada del butirato del medio de cultivo. A los 10-12 días de eliminar el

butirato observaron en el cultivo células morfológicamente distintas que aislaron e inicialmente denominaron HT29diff (renombradas como Cl.16E). Posteriormente, Williams y colaboradores (1990) obtuvieron las células AA/C1/SB por tratamiento de células de un adenocarcinoma pre-maligno durante 14 días con butirato 1 mM. Finalmente, Ho y colaboradores (1994), al tratar las células LS174T con butirato 0.5 mM durante 30 días y posterior siembra en medio sin butirato, observaron la aparición de focos de células morfológicamente diferentes; tras la selección de los mismos obtuvieron las células resistentes LS174T-D. Cuando se comparan las líneas celulares resistentes a butirato, entre sí y con respecto a sus células parentales, se observa que las principales diferencias radican en la velocidad de proliferación y, fundamentalmente, en el grado de diferenciación, aunque no es posible establecer un comportamiento similar entre ellas. Por ello, se procedió a caracterizar estos parámetros en las células BCS-TC2.BR2. En la actualidad, las células se encuentran en el subcultivo número 50, después de 2 años de propagarse en cultivo continuado en presencia de butirato 2 mM sin que se hayan observado diferencias significativas en su comportamiento (viabilidad, velocidad de proliferación, capacidad de adhesión, etc.), con respecto al momento en que se consideró establecida la línea celular.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS BCS-TC2.BR2

4.2.1 Estudios de proliferación celular

Al analizar, en la bibliografía, las características de distintas líneas celulares resistentes a butirato y las de sus respectivas células parentales, uno de los procesos en los que se observa diferencia es en la proliferación celular. Por ello, se procedió al estudio de las curvas de proliferación de las células BCS-TC2.BR2 y de sus células parentales, tanto en ausencia como en presencia de butirato 2 y 4 mM. En la figura 13 se recogen los resultados obtenidos en un experimento representativo. Como se puede apreciar, la fase de latencia es ligeramente inferior para las células BCS-TC2.BR2 (1-2 días) que para las células parentales (2-3 días). Hay que tener en cuenta que estos valores son aproximados dado que este parámetro depende de la densidad celular a la que se realice la siembra; al disminuir el número de células sembradas, la duración de la fase de latencia se incrementa. La explicación a este hecho podría radicar en que el aumento de la densidad celular provoca un incremento en la concentración de factores de crecimiento y otros productos secretados por las propias células. Este medio enriquecido favorecería la entrada de las células en el ciclo de división.

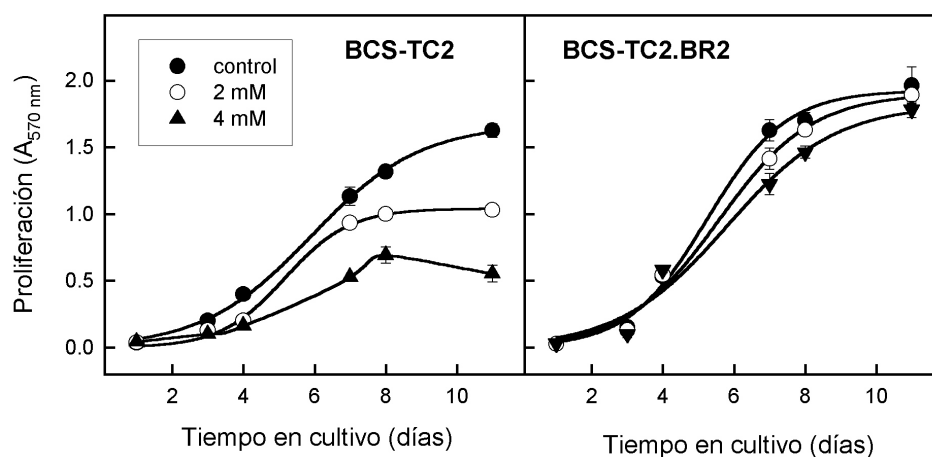


Figura 13.- Efecto del butirato sobre la proliferación de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.

Las curvas de proliferación, en ausencia de butirato (control) y en presencia de butirato 2 y 4 mM, para ambos tipos de células, se han obtenido sembrando 10^4 células por pocillo, en placas de 96 pocillos, en medio DMEM completo. La proliferación se valora a distintos tiempos mediante el ensayo del MTT, descrito en Materiales y Métodos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados obtenidos para 8 pocillos de cada punto experimental, de uno de los tres experimentos realizados.

Del análisis de las curvas de proliferación se puede determinar que, en ausencia de butirato, el tiempo de duplicación medio de las células BCS-TC2.BR2 es inferior al de las células BCS-TC2. Los valores obtenidos para ambos tipos de células se encuentran en el rango de 32-45 horas, lo que permite clasificar estas células entre las que exhiben una velocidad de proliferación intermedia, puesto que se han descrito líneas celulares de crecimiento más rápido como las WiDr (Noguchi y col., 1979) y de crecimiento mucho más lento como las SW1083 (Leiboviz y col., 1976) cuyos tiempos de duplicación son, respectivamente, 15 y 288 horas. Además, este resultado coincidiría con los datos obtenidos para otras líneas celulares en cultivo obtenidas por selección con butirato, como las células HL60 de leucemia y HT29diff de adenocarcinoma de colon. En estos casos, los tiempos de duplicación medio son menores que los de sus células parentales, y por consiguiente, presentan una mayor velocidad de proliferación (Augeron y Laboisie, 1984; Yen y col., 1995). Sin embargo, no es posible concluir que la obtención de células resistentes a butirato vaya asociada siempre a la selección de células con una mayor velocidad de proliferación puesto que el tiempo de duplicación medio para las células resistentes a butirato LS174T-D es casi el doble del de sus células parentales (Ho y col., 1994).

Cuando se analiza el efecto que el butirato ejerce sobre la proliferación de ambos tipos de células, se observa que las células BCS-TC2.BR2 son capaces de proliferar en presencia del agente. Aunque los cambios no son muy significativos, es posible detectar que el butirato

disminuye ligeramente la velocidad de proliferación. Por otro lado, como cabía esperar, en las células BCS-TC2 el butirato inhibe drásticamente la proliferación celular, siendo los efectos más acusados cuanto mayor es la concentración de agente. La disminución detectada a una concentración de butirato 4 mM podría sugerir que predomina el proceso de muerte celular sobre la proliferación. La inhibición de la proliferación de células tumorales por parte del butirato es un hecho ampliamente descrito en la bibliografía, tanto para células transformadas de colon (Schwartz y col., 1998; Harrison y col., 1999) como para células de otros orígenes tisulares (Fagot y col., 1994; Saito y col., 1998), y va acompañada de parada del ciclo celular en fase G1 (Siavoshian S y col., 2000). Además, el efecto sobre la proliferación de las células BCS-TC2 no sólo depende de la concentración de agente utilizado y del tiempo de tratamiento, sino también de cuál es el estado proliferativo en el momento en que se añade el butirato. Las curvas de proliferación que se recogen en la figura 13 se han obtenido añadiendo el agente en el momento de la siembra de las células. Sin embargo, si el butirato se añade durante la fase exponencial o en los cultivos confluentes, el efecto sobre la proliferación celular es ligeramente distinto. Su adición en fase exponencial produce un efecto más rápido, posiblemente porque en esta fase las células están activamente dividiéndose y los mecanismos de captura y procesamiento del butirato pueden estar más activos que en la fase de latencia. En confluencia y en fase estacionaria, sin embargo, el efecto es más tardío. Este retraso podría explicarse por dos hechos; por un lado, al ser menor la velocidad de proliferación sería necesario más tiempo para observar diferencias en la misma y, por otro, se podría producir una menor accesibilidad y disponibilidad del butirato en la fase estacionaria debido al alto número de contactos célula-célula y al crecimiento en multicapa, lo que podría dificultar la captura del agente.

4.2.2 Diferenciación celular

Durante el establecimiento de células resistentes a distintos agentes, así como en ciertos tipos de tumores, se observa que se produce una transición o un cambio desde un fenotipo epitelial hacia un fenotipo mesenquimal (Buisson y col., 1996; Ahmad y col., 1998). Así, en ciertos carcinomas, algunas regiones del tumor pueden adquirir características mesenquimales y las células presentan tanto características epiteliales como fibroblásticas, observándose la coexpresión de proteínas de filamentos intermedios tales como vimentina y citoqueratinas (Ahmad y col., 1998). Los resultados obtenidos de la expresión de citoqueratinas y de microscopía electrónica pusieron de manifiesto la naturaleza epitelial de las células parentales BCS-TC2 (Turnay y col., 1990).

Naturaleza epitelial

Para analizar el fenotipo de las células BCS-TC2.BR2 se ha evaluado la expresión de

citoqueratinas (marcador epitelial), así como de vimentina (marcador mesenquimal) mediante transferencia electroforética e inmunodetección empleando anticuerpos específicos. Como control positivo de células de naturaleza epitelial se han empleado las propias células BCS-TC2 mientras que, como control de células de origen mesenquimal, se han utilizado las células HT-1080 procedentes de un fibrosarcoma humano. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 14. Como se puede observar, tanto en las preparaciones de las células parentales como en las obtenidas por tratamiento con butirato, se detectan proteínas entre 45 y 60 kDa correspondientes a la expresión de citoqueratinas, mientras que no se observa la presencia de vimentina en dichos extractos celulares. Sin embargo, en las células HT-1080 aparece una banda de proteína, de masa molecular de alrededor de los 50 kDa, correspondiente a la vimentina y no se detecta la expresión de citoqueratinas. Estos resultados, confirman, por tanto, la naturaleza epitelial de las células BCS-TC2.BR2 y ponen de manifiesto la no reversión a un fenotipo mesenquimal en estas células.

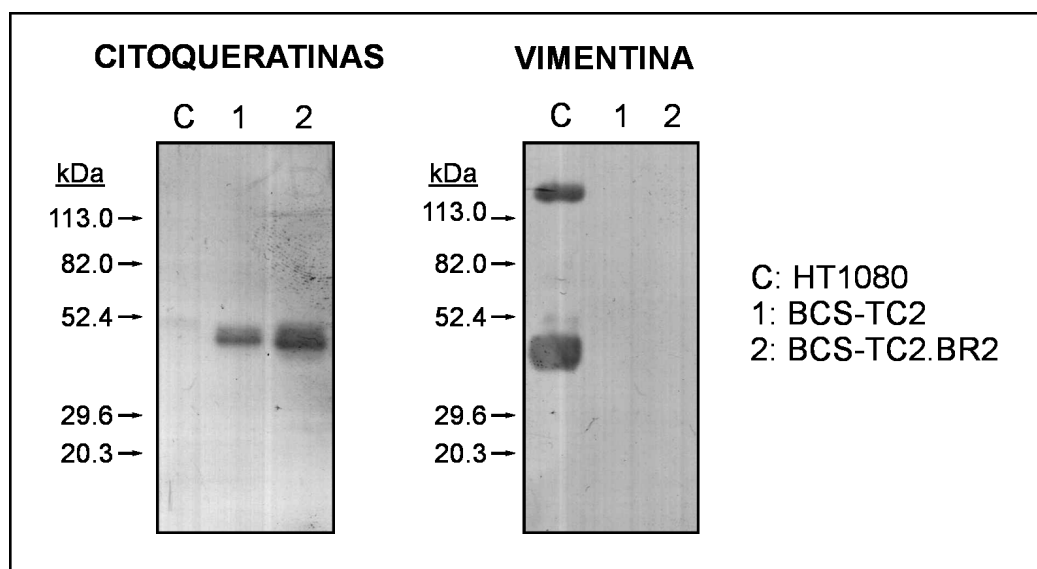


Figura 14.- Expresión de citoqueratinas y vimentina en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.

La expresión de citoqueratinas y vimentina se analiza cargando 10 µg de proteína de los correspondientes extractos celulares en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, desarrollándose la electroforesis y llevándose a cabo la inmunodetección según se describe en Materiales y Métodos. Los anticuerpos anti-pancitoqueratinas y anti-vimentina se emplean a una dilución 1/4.000 y 1/1.000, respectivamente, y el anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa a 1/5.000. El revelado se lleva a cabo empleando recativos de ECL.

Estudios morfológicos

Las características estructurales de las células BCS-TC2.BR2 se han analizado mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de superficie y de transmisión. En cuanto a la organización del cultivo, en las fotografías se puede apreciar el crecimiento en monocapa, así como su capacidad para formar multicapas como consecuencia de la pérdida de inhibición por contacto típica de las células transformadas (Figura 15 A-C).

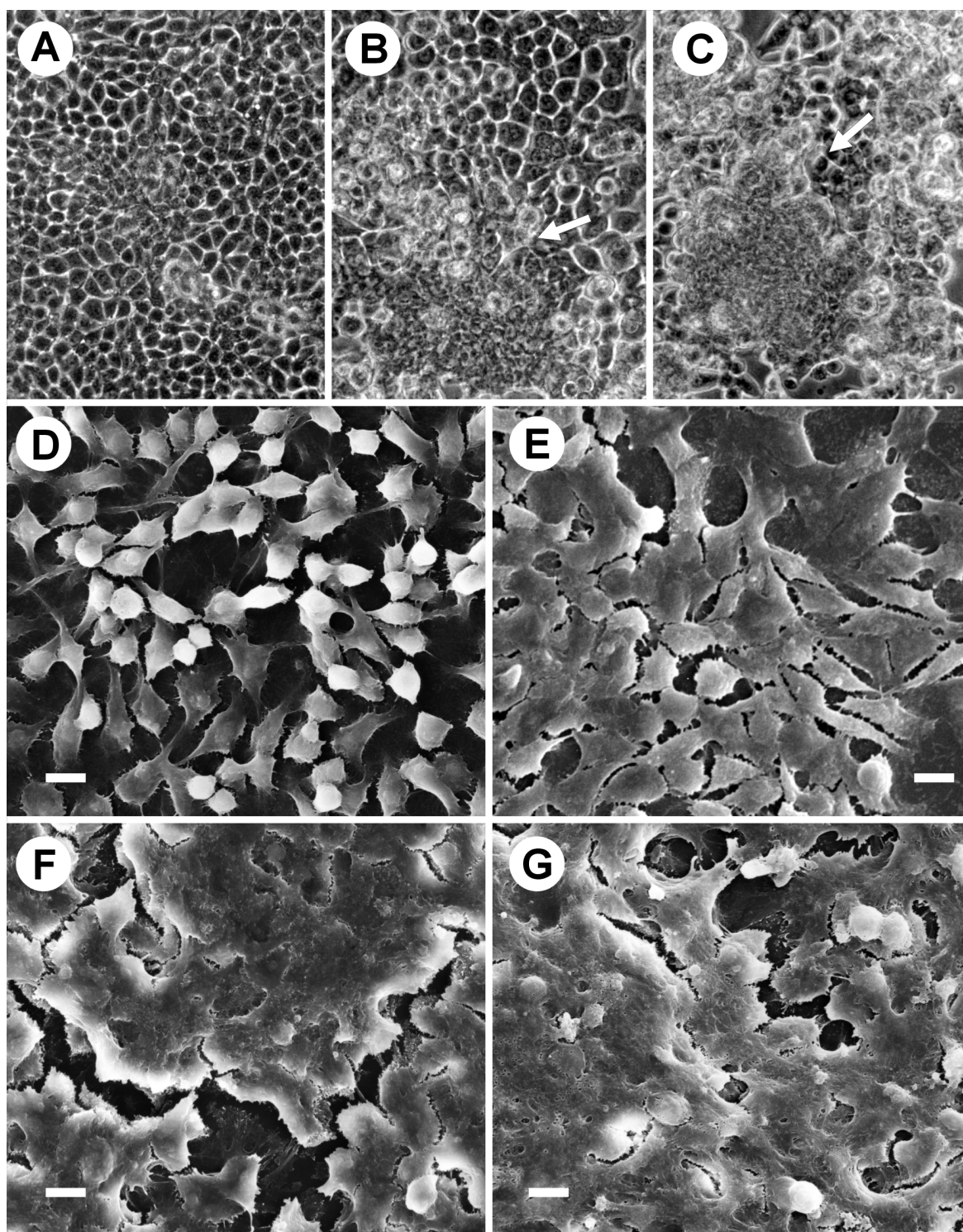


Figura15.- Microscopía óptica y electrónica de barrido de superficie de las células.

Los cultivos celulares (**A**: BCS-TC2; **B** y **C**: BCS-TC2.BR2) se fotografían (20 aumentos) y se preparan para microscopía electrónica según se describe en Materiales y Métodos. Células BCS-TC2 (**D** y **F**: barra 10 μ m) y células BCS-TC2.BR2 (**E** y **G**: barra 10 μ m). Las formaciones de tipo *dome* se indican con flechas.

Se puede observar que, en confluencia, la morfología de las células BCS-TC2 es poligonal, aunque hay áreas donde aparecen algunas células alargadas que se visualizan de forma más clara en cultivos no confluentes, y que se localizan preferentemente en los bordes de los clones. En cultivos confluentes de las células BCS-TC2.BR2 se observan dos tipos de poblaciones con aspecto diferente, en cuanto a tamaño y/o morfología. Predominan células muy pequeñas, de menor tamaño que las células parentales, empaquetadas o asociadas fuertemente que, posiblemente corresponden a formaciones de tipo *dome* o bóveda (Ho y col., 1994). Éstas están rodeadas de células poligonales de mayor tamaño. Los denominados *dome* son formaciones típicas de monocapas de epitelios transportadores a los que se atribuyen el transporte de iones y de agua a través de células epiteliales polarizadas y funcionales. Se definen como un grupo cohesivo de 30 o más células que están en diferentes planos pero permanecen unidas a la superficie de cultivo (Mariadason y col., 2000). En cultivos muy confluentes de células BCS-TC2.BR2 es posible apreciar estos acúmulos celulares de tipo bóveda (Figura 15 B y C), los cuales rara vez se observan en las células parentales.

En los cultivos de las células parentales (Figura 15 D) se puede observar, en estados no confluentes, la presencia de células redondas pero que permanecen adheridas a la monocapa. En cultivos confluentes la morfología celular prácticamente no se delimita y se detectan en muchas regiones multicapas (Figura 15 F). El aspecto de las células BCS-TC2.BR2 parece más homogéneo (Figura 15 E). En confluencia, y posiblemente correspondiendo con las regiones donde se inicia la formación de *domes*, se observan formas que reflejan una elevada adhesión entre células y asociaciones en multicapa (Figura 15 G).

Los análisis de microscopía electrónica de transmisión, reflejan que las células parentales muestran pocos signos de diferenciación. Así, en la mayor parte de estas células no se detecta la típica polarización característica de células epiteliales diferenciadas, observándose una morfología oval-poligonal con un núcleo grande, de forma irregular, y las microvellosidades o proyecciones citoplasmáticas de longitud variable, repartidas a lo largo de la superficie celular y predominando en las zonas de contacto con otras células (Figura 16 A). Las células BCS-TC2 presentan contactos célula-célula de tipo desmosoma (Figura 16 B), característicos de las células de origen epitelial, sin embargo, el número de este tipo de contactos celulares es bajo.

En el cultivo de las células BCS-TC2.BR2 (Figura 17), se observan algunos signos de diferenciación celular, sobre todo en relación con la polarización celular. Numerosas células tienen forma alargada/columnar en la que se aprecia una distribución asimétrica, más polarizada de los núcleos (Figura 17 A-C).

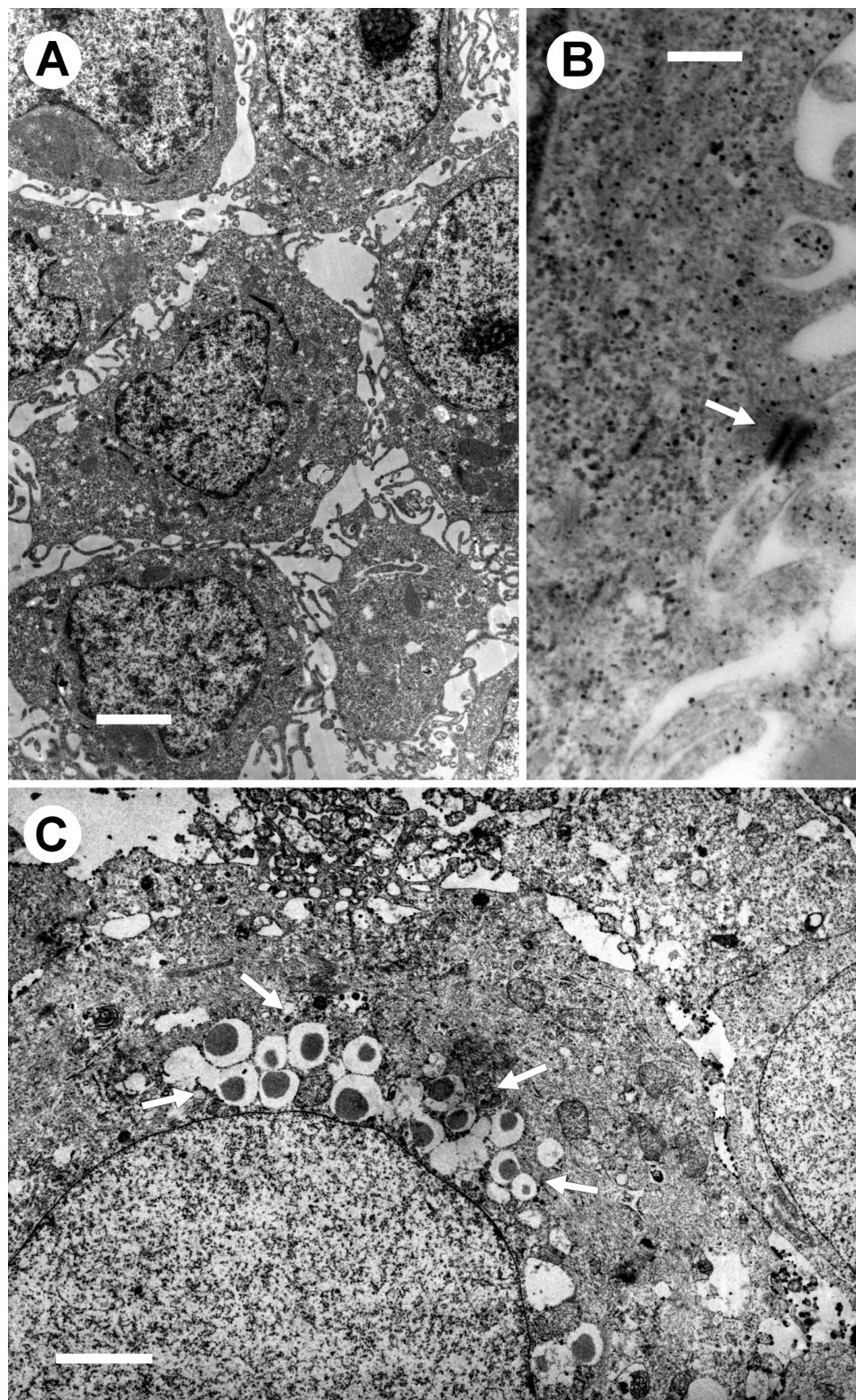


Figura16.- Microscopía electrónica de transmisión de las células BCS-TC2.

La preparación de las muestras se ha realizado como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Ultraestructura de las células BCS-TC2 (A: barra 2,5 μ m), detalle de un desmosoma (B: barra 0,25 μ m) y células BCS-TC2 tratadas durante 15 días con butirato 2 mM(C: barra 2 μ m).

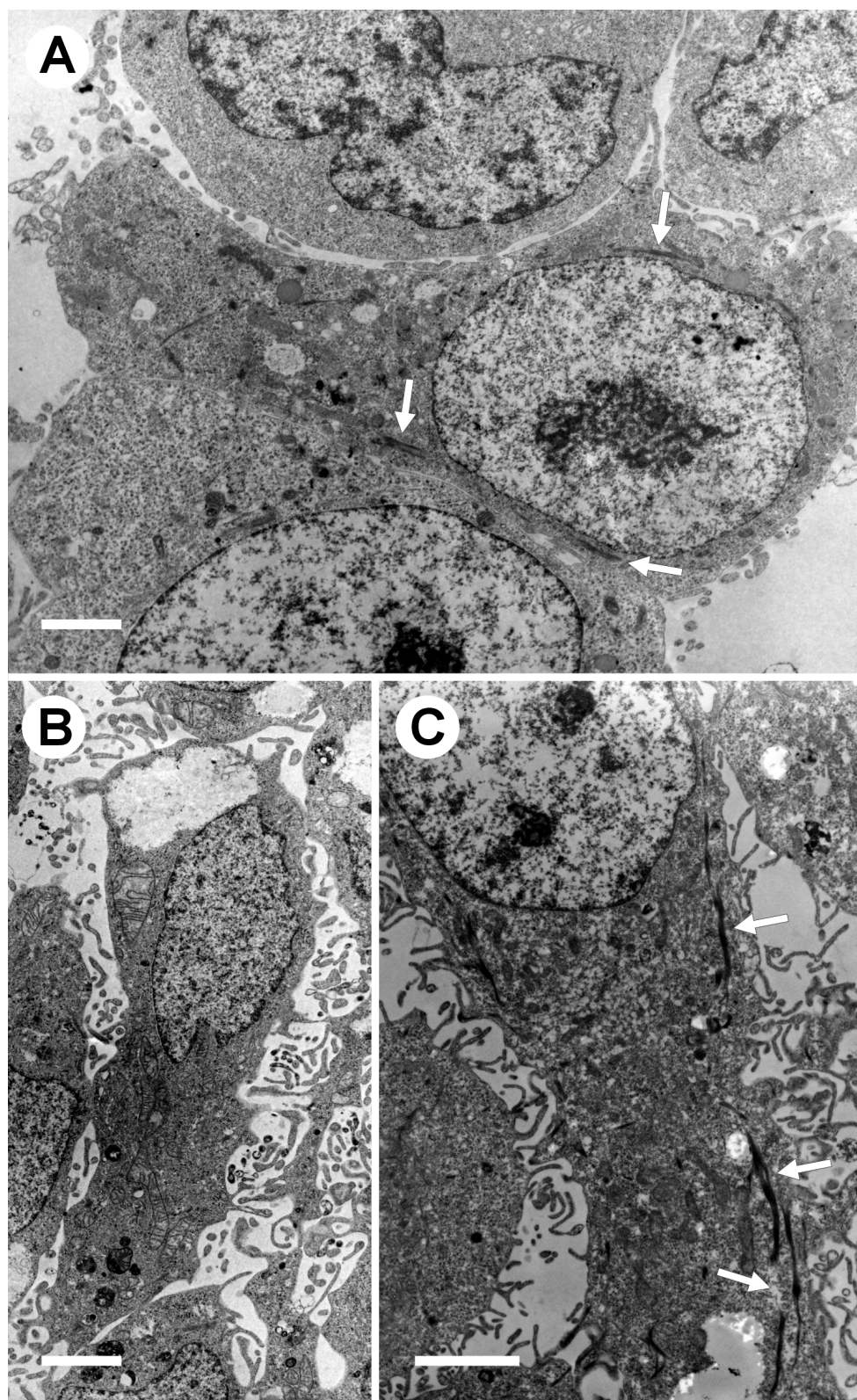


Figura17.- Microscopía electrónica de transmisión de las células BCS-TC2.BR2.

La preparación de las muestras se ha realizado como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Se muestra la estructura de las células, con aparición de una morfología columnar, indicándose con flechas los filamentos intermedios. (barra 2,5 μ m).

En las células epiteliales diferenciadas se pueden distinguir dos zonas en la membrana plasmática. Una de ellas es el polo apical, que se encuentra formando el denominado borde de cepillo y está orientado hacia el lumen intestinal. La otra zona se la conoce como membrana basolateral y es la responsable de establecer los contactos célula-célula y célula-sustrato (*in vivo*, la matriz extracelular; *in vitro*, el soporte o plástico de cultivo). La existencia de estas dos regiones se mantiene gracias a la disposición especial del citoesqueleto (Peterson y Mooseker, 1993). El aspecto de las células BCS-TC2.BR2, aunque se muestran signos de diferenciación, no se corresponde con el de las células epiteliales normales de colon o con el obtenido cuando las células Caco-2 se diferencian en cultivo. No se observa el típico borde en cepillo, donde tanto la distribución como la longitud de las proyecciones son uniformes.

Además, de la forma y disposición del núcleo, también se observa que se incrementan las estructuras filamentosas, posiblemente de filamentos intermedios (Figura 17C y 18 A), y el número de contactos célula-célula con la formación de múltiples desmosomas (Figura 18 B). Este hecho podría estar relacionado con el ligero mayor contenido en citoqueratinas observado en estas células (Figura 14). Los desmosomas, *in vivo*, son los encargados de establecer contactos célula-célula y proporcionar una mayor fortaleza y rigidez a los tejidos. Los filamentos intermedios se anclan a ellos a través de proteínas integrales de membrana, interconectándose entre células a través de la E-cadherina (Bracke y col., 1997). Tanto la presencia de desmosomas, como el incremento en los niveles de E-cadherina, se relaciona con células que presentan un fenotipo más diferenciado. Estudios llevados a cabo por el grupo ponen de manifiesto que el tratamiento con butirato induce diferenciación en las células BCS-TC2 y que, como consecuencia del mismo, se produce un incremento en la expresión de E-cadherina. Este incremento también se ha observado en otras líneas celulares de adenocarcinoma de colon habiéndose sugerido que el butirato modula la transcripción de la E-cadherina, incrementándose los contactos célula-célula (Barshishat y col., 2000). Además, por microscopía óptica se observa que, en cultivos no confluentes, las células BCS-TC2.BR2 tienden a asociarse dejando algunas lagunas o espacios libres, pero muy bien delimitados por células. En microscopía electrónica se ha observado que en estas regiones parece que la membrana plasmática está más activa, se detectan más prolongaciones citoplasmáticas. Por otro lado, en escasas células BCS-TC2.BR2, polarizadas o no, se observan estructuras vesiculares que, en comparación con otros estudios, podrían contener material lipídico o de tipo mucina, y que, por tanto, podrían corresponder a gránulos de secreción de mucinas (Figura 18 C). Otra de las características que también se puede resaltar es la presencia de cistas intracelulares o estructuras vesiculares perfectamente definidas donde se detectan proyecciones citoplasmáticas (Figura 18 C); estas cistas sólo se observan en las células parentales después del tratamiento con butirato.

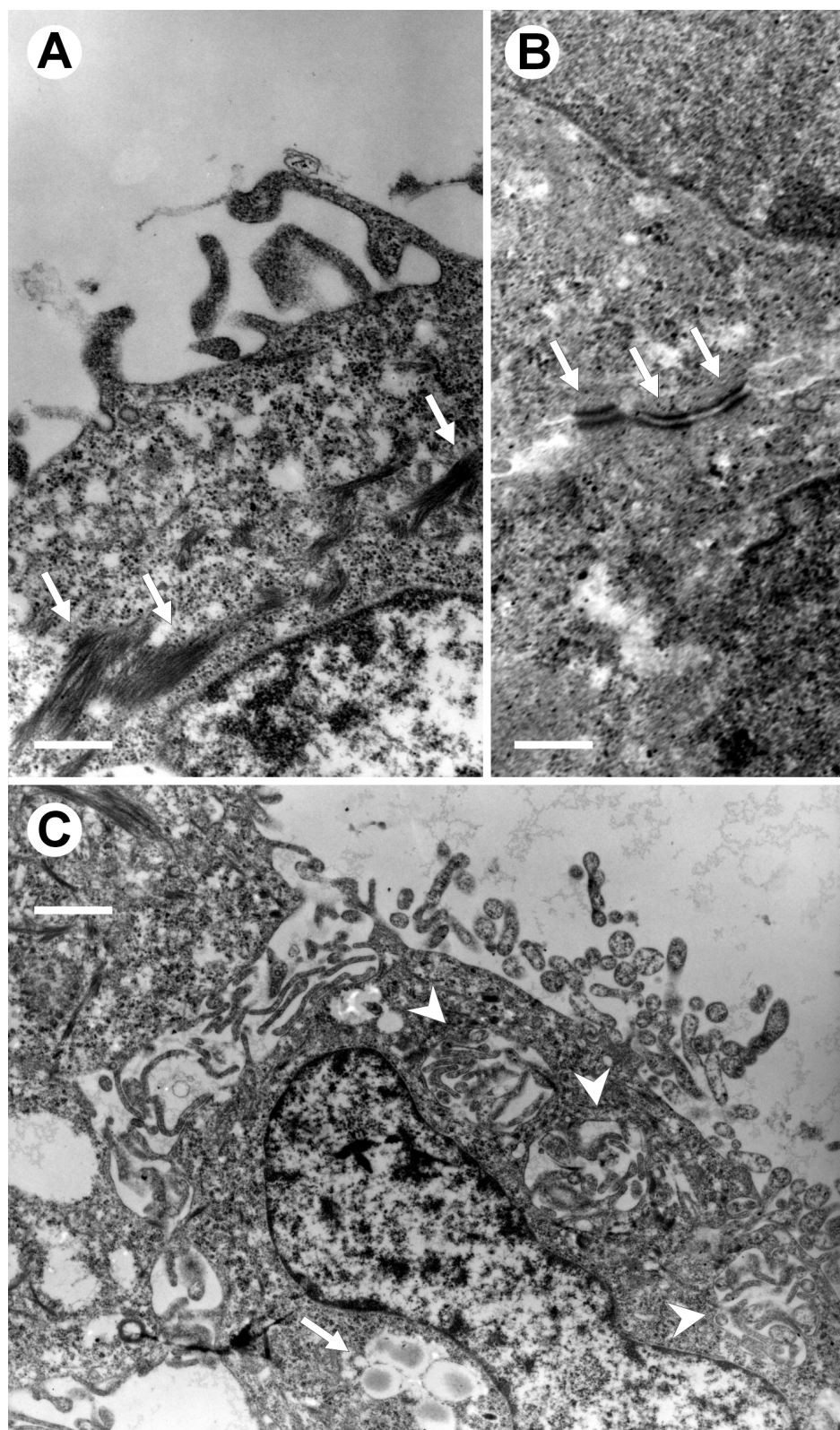


Figura18.- Microscopía electrónica de transmisión de las células BCS-TC2.BR2.

La preparación de las muestras se ha realizado como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Ultraestructura de las células BCS-TC2.BR2 en la que se puede apreciar filamentos intermedios (A: barra 0,6 μ m), desmosomas (B: barra 0,4 μ m), estructuras vesiculares, señaladas con flechas, y cistas intracelulares, señaladas con puntas de flecha (C: barra 1,1 μ m).

Las células epiteliales de colon comprenden una variedad de tipos celulares con características estructurales y bioquímicas distintas (células columnares, secretoras de mucus, etc.; apartado 1.1.1). Los estudios de inducción de diferenciación en células de adenocarcinoma de colon, empleando estrategias distintas, han dado lugar a la obtención de fenotipos muy variables (Augeron y Laboisse, 1984; Ho y col., 1994; Seto y Seligy, 1999). Durante el tratamiento de las células BCS-TC2 con butirato, de forma paralela al incremento en el grado de polarización celular, el acúmulo de microvellosidades y en la mayor actividad de fosfatasa alcalina (Navarro y col., 1997), se observa la aparición de un gran número de vacuolas o estructuras vesiculares, con material lipídico o de tipo mucina, orientadas hacia el lado apical (Figura 16 C). Por microscopía electrónica de barrido de superficie se puede también visualizar el deterioro y cambios que sufre el cultivo de las células BCS-TC2 después de 15 días de tratamiento con butirato. En la figura 19 A se puede observar que las células sin tratar se encuentran adheridas y bien extendidas; las células redondeadas están firmemente adheridas a otras células, formando multicapas. Las células tratadas con butirato (Figura 19 A y B) muestran una gran heterogeneidad en tamaño y, aunque se detectan regiones donde las células están bien adheridas y extendidas, el perfil de muchas células queda delimitado por la membrana que parece que se separa del soporte de cultivo. Además, en muchas de las células se observa una superficie muy activa (punteado) que posiblemente, por sus dimensiones, correspondan a un acúmulo de proyecciones de tipo *microvilli*, o a estructuras vesiculares (vacuolas).

En las micrografías de las células BCS-TC2.BR2 sólo se aprecian ocasionalmente algunos de los signos de diferenciación (delimitación de membrana luminal y basolateral) mientras que si se produce un incremento significativo en el número de células de tipo columnar donde el núcleo aparece polarizado hacia uno de los lados (Figura 17). Esto estaría de acuerdo con lo observado en otros casos donde se detectan células con gránulos de tipo mucina en cultivos de células preconfluentes pero que sin embargo desaparecen en cultivos postconfluentes y, de forma simultánea, se detecta la formación de *domes* (Ho y col., 1994). En los estudios realizados con butirato sobre otras líneas celulares los resultados son altamente contradictorios. Así, se ha sugerido que este agente induce la aparición de células columnares de carácter absortivo (Lesuffleur y col., 1990; Augenlicht y col., 1999). De hecho, la línea celular LS174T-D resistente a butirato presenta características ultraestructurales correspondientes a un fenotipo absortivo (Ho y col., 1994). Estos resultados estarían de acuerdo con otros estudios que indican que el butirato no es capaz de inducir la expresión de mucinas en distintos sistemas celulares (Velcich y col., 1995) e induciría la diferenciación sólo a través del linaje absortivo (Augenlicht y col., 1999). Sin embargo, al igual que ocurre con las células BCS-TC2, durante el tratamiento con butirato se detecta la aparición de células de naturaleza secretora (Barshishat y col., 2000). De hecho, durante el establecimiento de las

células HT29 resistentes al efecto del butirato, se detectó la aparición de clones celulares, que una vez aislados evolucionan hacia células columnares con capacidad para formar *domes* (clon 19A) mientras que otros exhibían un fenotipo que se caracterizaba por la secreción masiva de mucus (clon 16 E) (Augeron y Laboisie, 1984). Por tanto los resultados obtenidos permiten sugerir que el tratamiento con butirato de las células BCS-TC2 induce tanto un fenotipo secretor como absortivo y que, posiblemente, las células con fenotipo secretor desaparecen del cultivo tras sufrir el proceso de apoptosis.

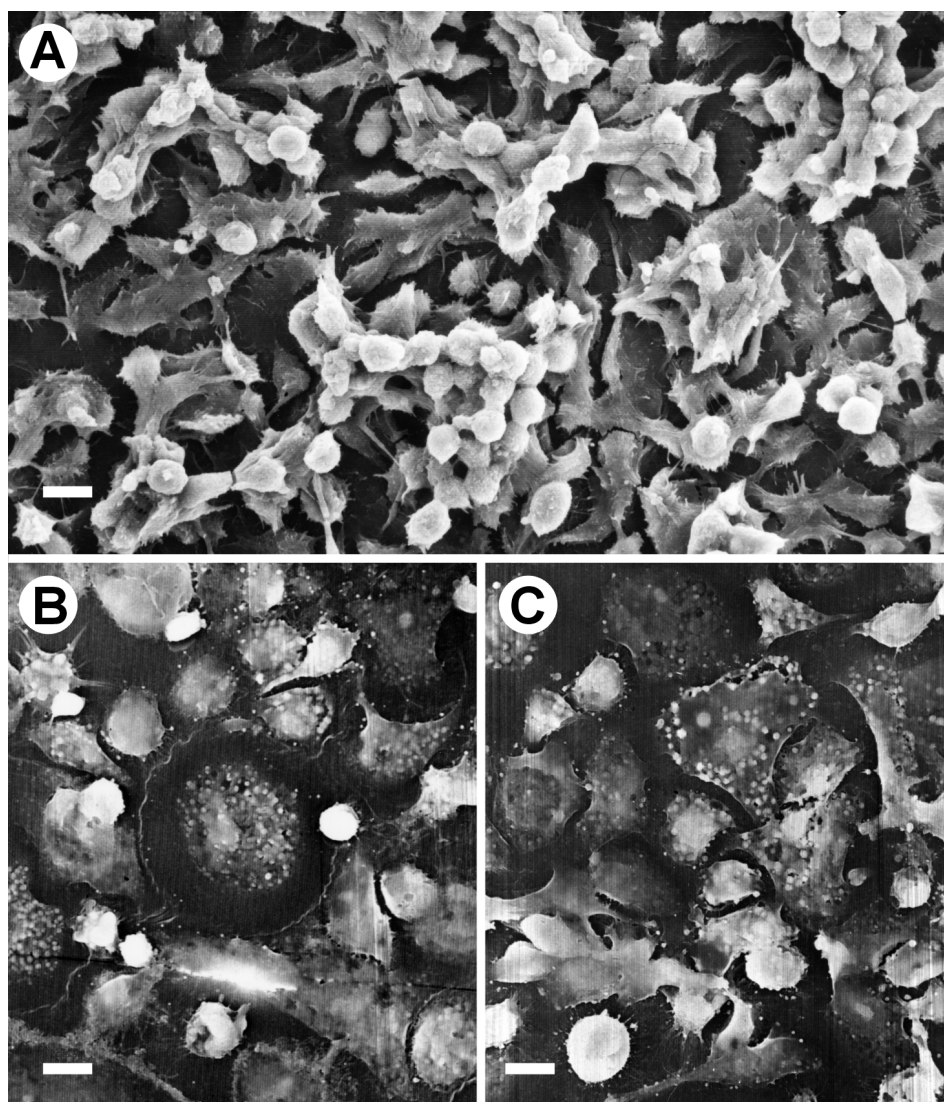


Figura19.- Microscopía electrónica de transmisión de las células BCS-TC2 tratadas con butirato.

La preparación de las muestras se ha realizado como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Células BCS-TC2 sin tratar con butirato (A), células tratadas con butirato a una concentración 2 mM durante 15 días (B y C). En todos los casos, las barras corresponden a 10 μ m.

Fosfatasa alcalina

La expresión y actividad de fosfatasa alcalina se incrementan de manera considerable durante el proceso de diferenciación *in vivo*, siendo relativamente baja en las células madre presentes en las criptas y superior en las células de fenotipo maduro que forman las microvellosidades intestinales (Hodin y col., 1994). Por ello, la fosfatasa alcalina se ha descrito como uno de los principales marcadores de diferenciación intestinal, siendo característica de las células con fenotipo absortivo. Se han estudiado otras hidrolasas asociadas a la zona del borde de cepillo para determinar si alguna de ellas puede considerarse como marcador de diferenciación (Chung y col., 1985; Mariadason y col., 2000). Con respecto a las disacaridasas (sacarasa, lactasa y trealasa), la actividad casi no se modifica; la aminopeptidasa disminuye en algún caso y se han publicado resultados contradictorios en relación a la dipeptidilaminopeptidasa IV.

Por tanto, dado el carácter de marcador de la fosfatasa alcalina, y con el fin de verificar si hay cambios en la diferenciación celular en las células BCS-TC2.BR2, se procedió a cuantificar la actividad de esta enzima en ambas líneas celulares. Para ello se cultivaron las células en ausencia de butirato, determinándose la actividad enzimática a distintos tiempos desde la siembra de las células. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 20.

Como se puede observar, aunque inicialmente la actividad de fosfatasa alcalina no es muy distinta entre ambas líneas celulares (33 y 82 mU/mg para las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2, respectivamente) se producen diferencias con el tiempo en cultivo. Así, mientras que en las células BCS-TC2 la actividad enzimática prácticamente no se modifica, en el caso de las células BCS-TC2.BR2 se produce un incremento significativo, siendo éste de aproximadamente 3 veces a los 12 días. Este resultado confirma el mayor grado de diferenciación enterocítica de las células resistentes a butirato. De hecho, en células de adenocarcinoma de colon poco diferenciadas como las HT-29, al igual que lo que ocurre en las células BCS-TC2, esta actividad no se modifica apreciablemente con el tiempo en cultivo (Schroy y col., 1994). Sin embargo, en otras líneas celulares, como las Caco-2, se produce un incremento en la fosfatasa alcalina durante el cultivo celular, llegando a adquirir, en cultivos postconfluentes, características similares a los enterocitos maduros (Hara y col., 1993; Halline y col., 1994). Además, estas células siguen respondiendo al efecto inductor de la diferenciación ejercido por el butirato aunque dando lugar a fenotipos divergentes (Mariadason y col., 2000). Por otro lado, en otros estudios, donde se obtuvieron las células HL-60 (células leucémicas promielocíticas) resistentes a butirato, se observa que estas células responden de forma distinta al efecto diferenciador ejercido por distintos agentes. Así, ni el butirato ni el ácido retinoico inducen diferenciación mientras que las células HL-60 responden a la vitamina D (Yen y Varvayanis, 1995).

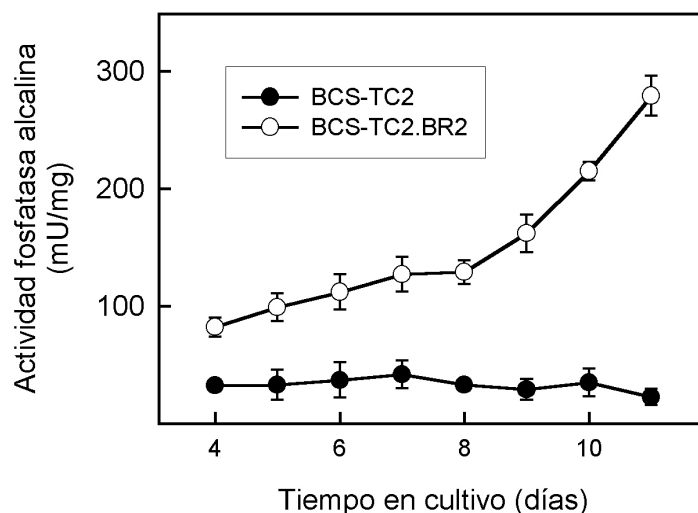


Figura 20.- Actividad de fosfatasa alcalina basal de las células BCS-TC2 Y BCS-TC2.BR2.

Se siembran 5×10^5 células por pocillo, en placas de cultivo de 6 pocillos, en medio DMEM completo. A distinto tiempo después de la siembra se determina la actividad de fosfatasa alcalina, como se describe en Materiales y Métodos, analizándose la cinética de formación del p-nitrofenol midiendo la absorbancia a 405 nm, durante 3 minutos, a 37°C. La unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 mol de producto por minuto a 37°C. Los resultados representan la media (\pm SD) de cinco experimentos independientes.

Con estos antecedentes, otro aspecto importante a analizar es si el butirato, aunque no inhiba la proliferación en las células BCS-TC2.BR2, sí afecte a la diferenciación de las mismas. Por ello, se procedió a evaluar el efecto que el tratamiento con butirato ejerce en la actividad de la fosfatasa alcalina en las células BCS-TC2.BR2, utilizándose como control las propias células parentales. Durante el tratamiento de las células BCS-TC2 con butirato, como ya se ha comentado, se produce desadhesión y liberación de células al medio de cultivo. El número de las mismas se incrementa considerablemente con el tiempo y concentración de agente empleada, de manera que, a 4 días de tratamiento con 8 mM, el número de células que permanecen adheridas es insuficiente para poder ser analizado. Teniendo en cuenta este hecho, se procedió a valorar la actividad de fosfatasa alcalina en las células de la monocapa y en las células liberadas al medio de cultivo. En el caso de las células BCS-TC2.BR2 no se ha observado desadhesión significativa, por lo que la actividad se valoró exclusivamente en la monocapa. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 21. Como se puede apreciar, en todos los casos, a los dos días de exposición al agente es posible detectar un incremento en la actividad de fosfatasa alcalina. El tiempo y la concentración necesaria para detectar efectos en otras líneas celulares de adenocarcinoma de colon es altamente variable; es función de las líneas celulares y de las condiciones de ensayo empleadas. Así, utilizando concentraciones de

agente comparables, en las células LIM1215 se puede apreciar un incremento en la actividad a las 24 horas (Rickard y col., 1999) mientras que en las células Caco-2 se requieren entre 48 y 72 horas para detectarse cambios (Litvak y col., 1998).

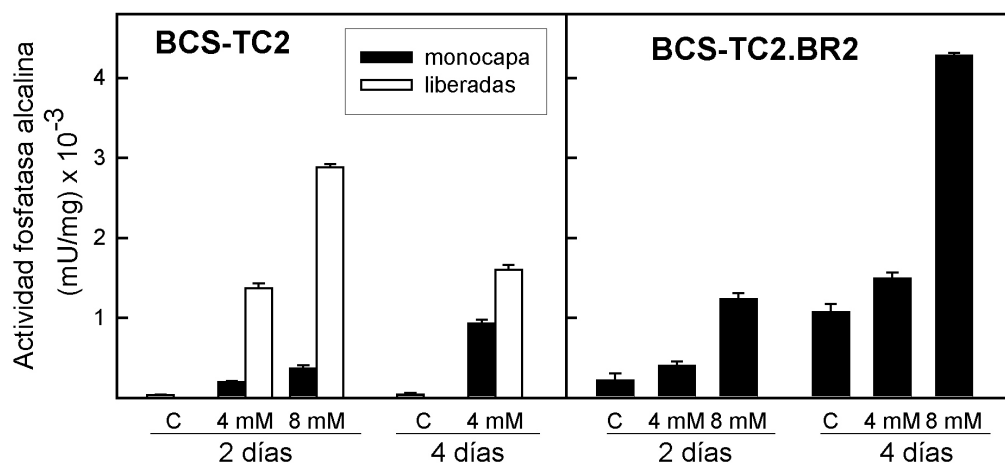


Figura 21.- Efecto del butirato sobre la actividad de fosfatasa alcalina celular.

Se siembran 2.5×10^5 células por pocillo, en placas de cultivo de 6 pocillos, en medio DMEM completo. Tres días después de la siembra, cuando los cultivos se encuentran en fase exponencial, se cambia el medio y se añade medio fresco en ausencia (C, control) o en presencia de butirato a 4 y 8 mM. Transcurrido el tiempo adecuado (dos o cuatro días) se evalúa la actividad enzimática en los extractos celulares obtenidos de la monocapa y de las células liberadas al medio de cultivo, como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 20. Los resultados representan la media (\pm SD) de cinco experimentos independientes.

Como se observa en la figura 21, en las células adheridas se produce un aumento considerable en la actividad de fosfatasa alcalina siendo dependiente de la concentración del agente y del tiempo de exposición. Así, tras tratamiento durante 4 días con butirato 4 mM se observa una actividad de 928 mU/mg para las células BCS-TC2 y 1500 mU/mg para las células BCS-TC2.BR2, lo que supone un incremento respecto de la actividad en ausencia de agente, de 30 y 18 veces, respectivamente. El aumento de esta actividad descrito en otras líneas de adenocarcinoma de colon es muy variable (entre 2 y 123 veces), habiéndose sugerido que la mayor o menor susceptibilidad para que el butirato incremente la actividad de la fosfatasa alcalina es un reflejo del grado de diferenciación celular. De hecho, las células procedentes de tumores poco diferenciados son menos sensibles a los efectos del agente (Chung y col., 1995; Buras y col., 1995). Sin embargo, otros estudios contradicen este postulado: por ejemplo, en las células Caco-2, de carácter bastante diferenciado respecto a otras líneas de colon, el tratamiento durante 3 días con butirato 2 mM sólo produce un incremento de 3 veces en la actividad de fosfatasa alcalina (Mariadason y col., 2000).

Por otro lado, debido a la desadhesión que se produce en la mayoría de los casos, resulta difícil establecer cual es el incremento real producido en la actividad enzimática. Así, como se puede apreciar, la actividad de fosfatasa alcalina de las células liberadas es considerablemente superior a la de las células adheridas (entre 3 y 12 veces en función de las condiciones de tratamiento utilizadas). Resultados similares se han obtenido con otras líneas celulares en las que el butirato induce apoptosis (Heerdt y col., 1994). En todos los casos también se ha observado un incremento en la actividad enzimática de las células adheridas. Por ello se ha sugerido que el butirato podría desencadenar que las células progresaran paulatinamente hacia la diferenciación terminal, iniciándose entonces el proceso de apoptosis y produciéndose, subsiguientemente, la liberación de las células al medio de cultivo. El análisis de la fragmentación de DNA tanto en las células liberadas como las que permanecen en la monocapa así lo confirma, siendo entre un 60 y un 80% superior la fragmentación encontrada en las células del sobrenadante respecto a la monocapa celular (Heerdt y col., 1994; Navarro y col., 1997).

En este contexto, el hecho de que tras el tratamiento de las células BCS-TC2.BR2 con concentraciones de butirato superiores a 2 mM no se observe la liberación de células al medio de cultivo, sugiere que no se está induciendo el proceso de apoptosis. Sin embargo, se produce incremento en el grado de diferenciación, observándose un aumento muy significativo de la actividad de fosfatasa alcalina. Ello permite sugerir que, para que se produzca la apoptosis, además de la diferenciación celular se requieren otros estímulos. Este hecho estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en las células Caco-2, donde, aunque se alcanzan niveles muy parecidos de actividad de fosfatasa alcalina tras inducir la diferenciación por dos vías distintas (cultivos postconfluentes o tratamiento con butirato), sin embargo, sólo en las células tratadas con butirato se induce apoptosis (Mariadason y col., 2000).

4.2.3 Resistencia a apoptosis

Efecto de concentraciones mayores de butirato

Los datos anteriores parecen sugerir que las células BCS-TC2.BR2 pueden ser resistentes a la inducción de apoptosis inducida por el butirato incluso a concentraciones superiores a 2mM. Para verificar este hecho se analizó el efecto que, sobre ambas líneas celulares, ejerce el butirato a concentraciones hasta 50 mM.

En las células BCS-TC2, como cabía esperar, se observa un deterioro muy rápido del cultivo como consecuencia de la muerte celular por apoptosis, lo que se refleja en fragmentación nucleosomal del DNA (Figura 22A). En las células BCS-TC2.BR2 a las 24 horas de tratamiento, se comienzan a perfilar diferencias entre las distintas concentraciones

utilizadas. Así, mientras que para concentraciones bajas (2, 4 y 10 mM) se observa que la viabilidad celular es alta, a partir de 20 mM se empiezan a detectar bastantes células desadheridas. Este efecto es más acusado a 50 mM y se incrementa con el tiempo de tratamiento. Sin embargo, cuando se analiza el DNA genómico, no se aprecia fragmentación nucleosomal en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 22B).

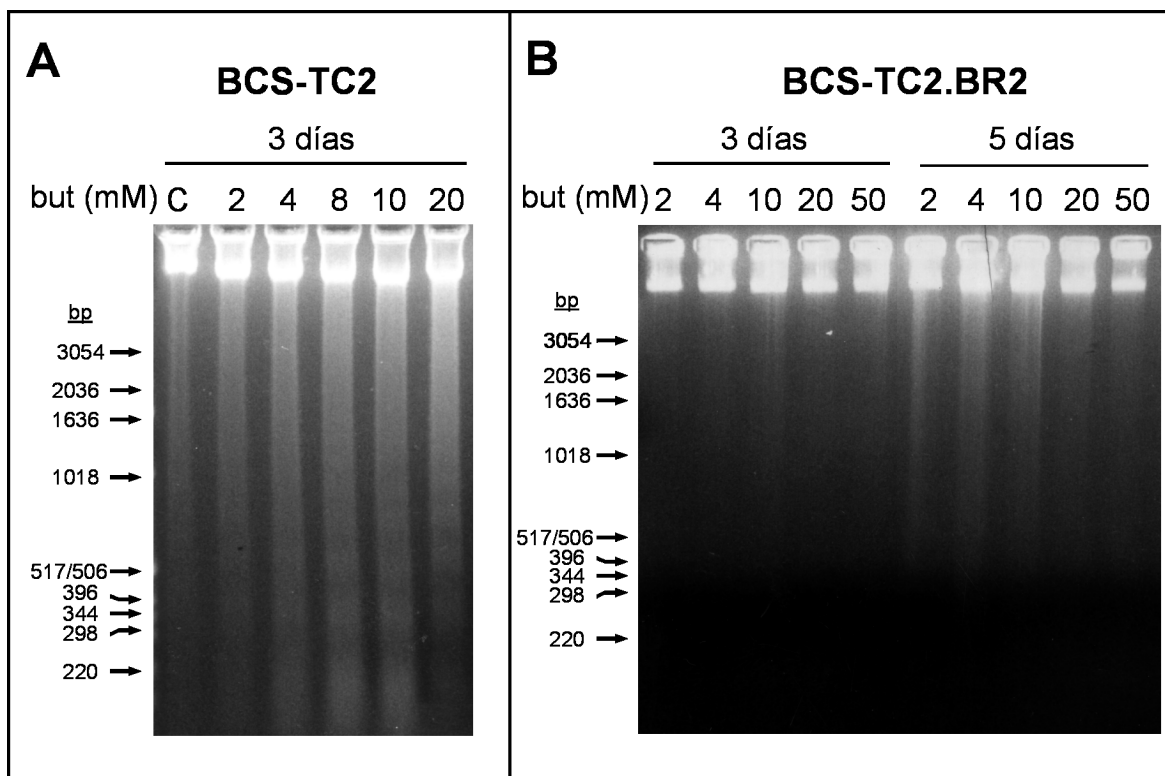


Figura 22.- Efecto del butirato en la fragmentación nucleosomal del DNA genómico.

Se siembran 5×10^5 células por pocillo, en placas de 6 pocillos, en medio de cultivo DMEM completo (células parentales) o suplementado con butirato 2 mM (células BCS-TC2.BR2). A los 2 días, cuando las células se encuentran en fase exponencial, se cambia el medio y, en los dos casos, se añade medio fresco conteniendo concentraciones de butirato entre 2 y 50 mM. Tras incubarse las células durante 3 y 5 días, éstas se raspan, se lavan con PBS y se recogen por centrifugación. El procesamiento de las muestras para la obtención del DNA genómico se realiza como se indica en Materiales y Métodos. En la figura se muestra el análisis de estas muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Las concentraciones de butirato que normalmente se utilizan para analizar los efectos de este agente en cultivos celulares oscila entre 1 y 5 mM. Por ejemplo, en las células Caco-2 de adenocarcinoma de colon, la concentración óptima para inducir diferenciación celular es de 2 mM; a mayores concentraciones (10 mM) no se observa efecto sobre la actividad de fosfatasa alcalina (Mariadason y col., 2000). Este hecho se ha justificado considerando que, posiblemente, altas concentraciones de butirato (mayores de 4 mM) inducen un alto grado de necrosis (Gibson y col., 1992; Mariadason y col., 2000). Estas concentraciones son bajas

respecto a los niveles presentes en el lumen del colon, los cuales están alrededor de 20 mM (Russo y col., 1999). Sin embargo, se ha sugerido que las células epiteliales colónicas están expuestas a concentraciones considerablemente inferiores debido a la presencia de la capa de mucus, que reduce considerablemente la difusión del butirato. *In vitro*, al no existir esta protección se ha observado que, en la mayor parte de las células de colon, concentraciones superiores a 4 mM ejercen efectos citotóxicos con lisis y vertido del contenido celular (Gibson y col., 1992). Por ello, posiblemente, la disminución en la viabilidad de las células BCS-TC2.BR2 observada a partir de concentraciones de 20 mM, sea debida a una acción citotóxica del butirato independiente del proceso de apoptosis.

Actividad de caspasa 3

Previamente se ha sugerido que el butirato induce apoptosis mediante un proceso iniciado por la inhibición de la histona desacetilasa, lo que resultaría en la expresión de algún gen implicado en muerte celular que actuaría de forma sinérgica con la vía apoptótica mitocondrial regulada por Bcl-2 (Medina y col., 1997). Todo ello convergería en la activación del principal efector apoptótico, la caspasa 3. Otros estudios también ponen de manifiesto que, tras inducir el proceso apoptótico con butirato, se produce una activación de esta proteasa (Heerdt y col., 1998; Giuliano y col., 1999; Chai y col., 2000). Por ello se procedió a determinar si se observaba activación de la caspasa 3 durante el tratamiento con butirato en ambos tipos de células. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 23.

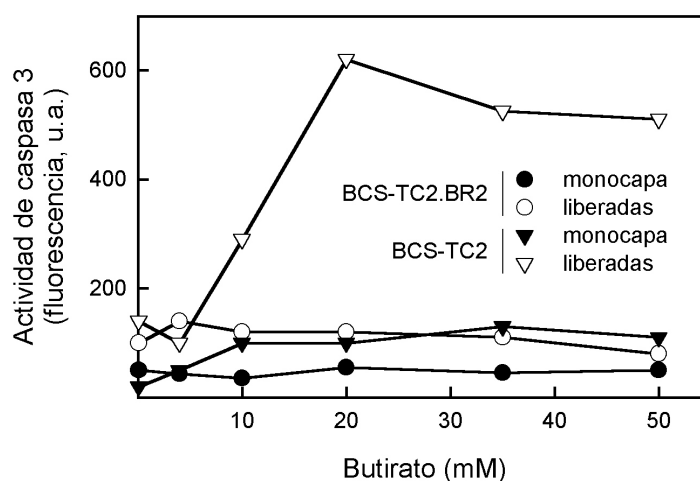


Figura 23.- Efecto del butirato en la actividad de caspasa 3 de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.

Se siembran 2×10^5 células por pocillo, en placas de 6 pocillos, en medio DMEM completo y se mantienen en condiciones normales de cultivo. Cuando las células están en fase exponencial, se cambia el medio de cultivo y se añade medio fresco conteniendo diferentes concentraciones de butirato. A los tres días se recogen por separado las células de la monocapa y las liberadas al medio. Las muestras se procesan como se describe en Materiales y Métodos para evaluar la actividad de caspasa 3. La actividad se expresa en unidades de fluorescencia arbitrarias.

Como se puede apreciar, esta actividad no se modifica en las células BCS-TC2.BR2 con el tratamiento con butirato, incluso a una concentración de 50 mM. Sin embargo, en las células parentales, aunque no se detecta un incremento en la actividad de esta proteasa en las células adherentes, sí se pone claramente de manifiesto en las células liberadas al medio de cultivo. Este incremento es dependiente de la concentración de butirato, alcanzándose un valor máximo de aproximadamente 6 veces la actividad control para concentraciones de agente en torno a 20 mM. Estos niveles de activación son coincidentes con los observados en otras células de adenocarcinoma de colon (LIM 1215) (Medina y col., 1997). Cuando estas células se exponen a tres ciclos de butirato se selecciona una población resistente a los efectos del agente (aunque no de forma permanente) donde, como en el caso de las células BCS-TC2.BR2, la actividad de caspasas prácticamente desaparece. En el caso de las células LIM 1215, también se ha observado una correlación entre los niveles de p21 y la resistencia a apoptosis inducida por butirato (Chai y col., 2000).

Expresión de p21

El inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, la proteína p21, modula la proliferación celular a través de su unión a distintos complejos ciclinas/CDKs provocando parada del ciclo celular. Sus niveles también se incrementan durante la respuesta apoptótica provocada por múltiples agentes como el taxol, la adriamicina, el etopósido y el interferón gamma (Kano y col., 1997; Sheikh y col., 1997). El butirato también parece incrementar la expresión de esta proteína (Heerdt y col., 1998; Chai y col., 2000). Por otro lado, la sobreexpresión de la p21 parece desempeñar un papel protector frente a la apoptosis y su deficiencia favorecería, como se ha puesto de manifiesto a partir de experimentos de sobreexpresión ectópica de p21 y mediante el empleo de ratones deficientes para esta proteína (Gorospe y col., 1996 y 1997; Sheikh y col., 1997). Teniendo en cuenta estos datos, se analizó la expresión de la proteína p21 en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 con el fin de comprobar si los distintos efectos provocados por el butirato se relacionan con diferencias en los niveles constitutivos de proteína y/o su modulación por dicho agente. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 24.

Como se puede apreciar los niveles basales de proteína son muy bajos para ambas líneas celulares. Sin embargo, el tratamiento con butirato provoca una inducción en la expresión de la proteína p21 tanto en las células BCS-TC2 como BCS-TC2.BR2. La inducción acontece, además, de manera muy temprana (24 horas) al igual que ocurre en otros sistemas (Nakano y col., 1997; Archer y col., 1998), llegándose, incluso, a detectarse a los 30 minutos en células de hepatocarcinoma (Yamamoto y col., 1998). Se cree que esta inducción se produce por activación transcripcional en el sitio Sp1 del promotor del gen que codifica para la proteína p21 (Nakano y col., 1997) y que la hiperacetilación de histonas es, al menos en

parte, la responsable de esta activación (Archer y col., 1998). Parece también que su inducción por butirato es independiente de la proteína p53 ya que, en la mayoría de los casos, la sobreexpresión de ésta disminuye o no varía (Saito y col., 1998; Giuliano y col., 1999) a pesar de ser su más conocido inductor. En este caso, la inducción de la proteína p21 también sería independiente de la de p53, ya que, estudios previos del grupo parecen sugerir que el tratamiento con butirato disminuye drásticamente los niveles de la proteína p53 en las células BCS-TC2.

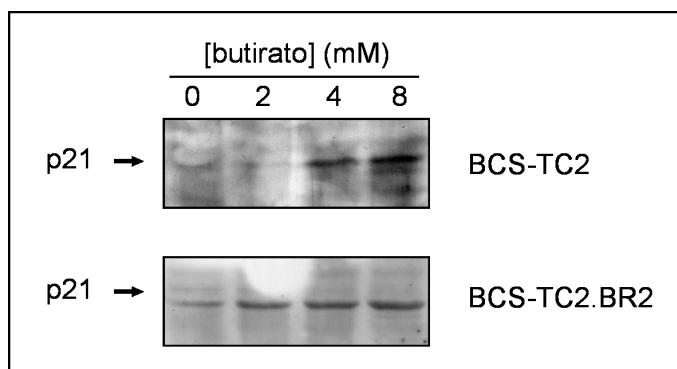


Figura 24.- Efecto del butirato en la expresión de p21 en células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.

Se siembran $7,5 \times 10^5$ células en placas de cultivo, 10 cm de diámetro, en medio DMEM completo. Cuando las células se encuentran en fase exponencial, se retira el medio y se añade medio fresco en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de butirato sódico. Transcurridas 24 horas, se recogen los extractos por raspado y se analiza la expresión de p21 mediante *Western blot*. Se aplican 50 μ g de proteína por pocillo empleándose geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS. La transferencia a membranas de nitrocelulosa y la inmunodetección se realiza como se describe en Materiales y Métodos. El anticuerpo anti-p21 se emplea a una dilución 1/200 y el anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa a 1/5.000. El revelado se lleva a cabo por ECL.

Al igual que ocurre en otros sistemas celulares (Yamamoto y col., 1998; Giuliano y col., 1999), el incremento de la proteína p21 en las células BCS-TC2 podría relacionarse con el bloqueo de la proliferación y la inducción de apoptosis que provoca el butirato en estas células. La sobreexpresión de la proteína p21 puede inducir parada del ciclo celular en G1 y bloqueo en la entrada en la fase S bien por inactivación de las ciclinas o bien inhibiendo la actividad del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Sin embargo, esta correlación no es tan obvia para las células BCS-TC2.BR2 ya que, como no se produce apoptosis, el incremento sólo se podría justificar teniendo en cuenta que, en presencia de butirato, se produce una disminución en la velocidad de proliferación, tanto mayor cuanto mayor es la concentración de agente empleada (Figura 13). Los resultados obtenidos estarían de acuerdo con lo que se ha descrito recientemente en el tratamiento con butirato de las células de adenocarcinoma de colon LIM1215, donde se observa la inducción de la expresión de la proteína p21 así como la aparición de un fragmento proteolítico denominado p15. Este fragmento surge como resultado de la actuación de distintas caspasas, activadas como

consecuencia de la inducción de apoptosis por este agente. La secuencia de corte de las caspasas (-DHVDL-) está localizada entre los dominios de unión a CDK/ciclinas y PCNA de la proteína p21; este corte provoca la pérdida de su función y alteración de su localización subcelular (Chai y col., 2000). Como se observa en la figura 24, en el tratamiento de las células parentales no sólo induce la expresión de la proteína; también puede observarse cierto grado de proteólisis que se podría correlacionar con la actividad de la caspasa-3 detectada (Figura 23). Al igual que en las células BCS-TC2 .BR2 (Figura 24), en la población de células LIM 1215 resistente a butirato, aunque se detectan mayores niveles de la proteína p21, no se aprecia el fragmento p15 que resultaría de la actividad proteolítica de la caspasa 3 (Chai y col., 2000). Estos estudios, en conjunto, parecen sugerir que, aunque el butirato incrementa la expresión de la proteína p21 durante el proceso de apoptosis, esta inducción no desencadena de manera directa la muerte celular sino que es necesaria la activación de caspasas para que se produzca, pudiendo participar el fragmento p15 como señal apoptótica. Todos estos resultados parecen indicar que las células BCS-TC2.BR2 tienen bloqueado el proceso apoptótico en alguna etapa previa a la activación de la caspasa-3.

Expresión de Bcl-2 y Bax

La función de la familia de proteínas Bcl-2 es regular el proceso de apoptosis; así, mientras que algunos miembros protegen, por ejemplo Bcl-2, otros promueven la muerte celular, por ejemplo, Bax (apartado 1.4.2). En el colon, Bcl-2 está principalmente localizado en la base de las criptas (Hague y col., 1994), mientras que Bax se expresa en la parte superior (Krajewski y col., 1995). El gradiente de distribución de proteínas de la familia Bcl-2 a lo largo de la cripta colónica es una evidencia indirecta de que la muerte celular programada constituye el mecanismo por el cual la longitud de la cripta permanece constante (Hague y col., 1996). La proteína Bcl-2 se localiza en la membrana externa de la mitocondria y previene de la iniciación de la apoptosis bloqueando la liberación del citocromo c (Yang y col., 1997). La posible protección que confiere Bcl-2 contra la apoptosis inducida por butirato tiene diferentes resultados dependiendo del tejido de origen y del tipo de línea celular. Se han descrito tanto incrementos (Saito y col., 1998; Chung y col., 1998) como represión (Mandal y Kumar, 1996; Giuliano y col., 1999) e incluso ausencia de efectos (Medina y col., 1997; Suzuki y col., 1998). También se ha sugerido que la capacidad para inducir la expresión de Bax puede ser importante en la determinación de si Bcl-2 es capaz de proteger contra la apoptosis provocada por el butirato (Chung y col., 1998; Giuliano y col., 1999).

La evaluación de los niveles de proteína Bcl-2 y Bax en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 mediante *Western blot*, con anticuerpos específicos, ha dado un resultado negativo. Ni siquiera la adición de butirato sódico a los cultivos permitió detectar la existencia de estas proteínas. Se disponía también de anticuerpos frente a Bcl-2 marcados con FITC, por lo

que además se intentó evaluar por citometría de flujo la expresión de esta proteína. Los histogramas han arrojado también un resultado negativo tanto para las células BCS-TC2 como para las BCS-TC2.BR2 tratadas o no con butirato, mientras que claramente se ha detectado la expresión de la proteína Bcl-2 en las células sanguíneas utilizadas como control. La no de expresión de Bcl-2 se ha descrito también para otros tipos de células. Por ejemplo, en la línea celular de adenoma AA/C1 y la de carcinoma S/KS/F1, ambas de colon, tampoco se detecta su expresión (Hague y col., 1997). Además, la transfección de células con Bcl-2 protege de la apoptosis de manera desigual. En este mismo estudio, pero empleando otras líneas celulares de colon que expresan Bcl-2 constitutivamente, el tratamiento con butirato sódico reprime la expresión de esta proteína induciendo la apoptosis (Hague A y col., 1997).

Los resultados obtenidos parecen indicar que la resistencia a la inducción de la apoptosis en las células BCS-TC2.BR2 no puede ser atribuida a diferencias significativas en la expresión de proteínas del tipo Bcl-2 y Bax, como se ha indicado en otros casos (Saito y col., 1998). No obstante, dado que su expresión es bastante común en gran variedad de cánceres humanos, incluidos próstata, colon, pulmón, estómago, riñón, neuroblastoma, linfomas no-Hodgkin y leucemias (Reed, 1995), y que alteraciones en estas proteínas se han demostrado durante la progresión desde adenoma a carcinoma de colon (Figura 3), no se puede descartar por completo su expresión y se intentará evaluar la misma por otros métodos más sensibles.

4.3 REVERSIBILIDAD DE LA RESISTENCIA A BUTIRATO

En 1995, Yen y colaboradores obtuvieron una línea celular resistente a butirato a partir de células HL-60 de leucemia humana. Para ello, fueron incrementando paulatinamente la concentración de butirato durante 30 días hasta alcanzar concentraciones de 1 mM. En estas condiciones, las células se mantuvieron durante más de 3 meses, permaneciendo estables sus características. Sin embargo, observaron que esta resistencia probablemente no era consecuencia de un cambio genético ya que al mantener estas células durante 3 días en ausencia de butirato, se producía la pérdida del fenotipo resistente. También, en diversas líneas celulares se ha descrito reversibilidad de los efectos del butirato tras la eliminación del agente (Devedjian y col., 1996; Chai y col., 2000).

Teniendo en cuenta estos datos, cabría pensar que la resistencia a butirato de las células BCS-TC2.BR2 fuese una resistencia transitoria y que la eliminación del butirato revirtiera la capacidad de estas células para proliferar en presencia de este agente. Para comprobar este hecho, se procedió a retirar el butirato del medio de cultivo de las células BCS-TC2.BR2. Durante los dos primeros meses en ausencia de butirato, no se observan cambios morfológicos apreciables, las células proliferan y se mantiene una viabilidad celular normal. Estas células pueden presentar características distintas a las células parentales BCS-TC2.BR2 por lo que para diferenciarlas se las ha denominado BCS-TC2.BR.

Con objeto de verificar si la resistencia a butirato es de carácter permanente en este sistema, las células BCS-TC2.BR se volvieron a tratar con butirato y se ha analizado su efecto

sobre la proliferación y en el grado de diferenciación celular. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 25. Como se puede apreciar en la figura 25A, el comportamiento es muy similar al de las células BCS-TC2.BR2; los tiempos de duplicación son comparables y la adición de butirato únicamente disminuye ligeramente la velocidad de proliferación, aunque la viabilidad celular sigue siendo elevada, y no se observan signos de muerte celular. Estas células se han mantenido en cultivo en ausencia de butirato casi dos años, habiendo sido subcultivadas alrededor de 40 veces. Durante este tiempo, su capacidad para crecer en presencia de este agente no se ha modificado, por lo que, de acuerdo con estos resultados, se puede concluir que las células BCS-TC2.BR presentan un fenotipo resistente estable y que la resistencia de las células BCS-TC2.BR2 no es reversible.

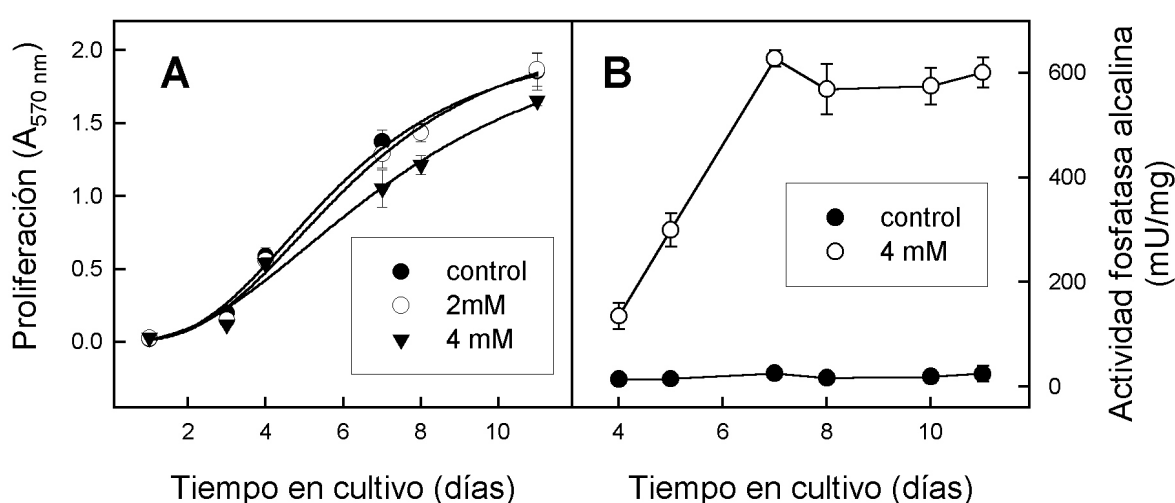


Figura 25.- Efecto del butirato en la proliferación y actividad de fosfatasa alcalina de las células BCS-TC2.BR.

(A) Se siembran 10^4 células por cada pocillo, de placas de 96 pocillos, en medio DMEM completo en ausencia (control) o en presencia de distintas concentraciones de butirato. La proliferación se valora a distinto tiempo mediante el ensayo de MTT descrito en Materiales y Métodos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados obtenidos para 8 muestras de uno de los experimentos realizados. (B) Se siembran 5×10^5 células por pocillo en placa de 6 pocillos, en medio DMEM completo. Cuando las células están en fase exponencial, se les cambia el medio y se añade medio fresco en ausencia o en presencia de butirato a la concentración indicada. Se recogen las células a distintos tiempos y se valora la actividad de fosfatasa alcalina como se recoge en Materiales y Métodos. Los datos corresponden a las medias (\pm SD) de los cinco experimentos realizados.

Se ha analizado también el grado de diferenciación de las células BCS-TC2.BR mediante microscopía electrónica de transmisión y determinación de la actividad de fosfatasa alcalina. En cuanto a las micrografías electrónicas, al igual que en el caso de las células BCS-TC2.BR2, se aprecian características que reflejan un ligero mayor grado de diferenciación que las células BCS-TC2 (células columnares y desmosomas). Resultados similares se han descrito en otros estudios, por ejemplo las células Clon 16E y LS174T-D (obtenidas también tras selección con butirato), alcanzan un fenotipo diferenciado estable en ausencia del agente

(Augeron y Laboisie, 1984; Ho y col, 1994). Sin embargo, en lo que se refiere a la actividad de fosfatasa alcalina se observan diferencias entre estas células y las células BCS-TC2.BR2. Las células BCS-TC2.BR2 en ausencia de butirato se diferencian con el tiempo en cultivo (Figura 20); sin embargo, en las células BCS-TC2.BR no se observa modificación en la actividad de fosfata alcalina con el tiempo en cultivo (Figura 25B). Este resultado parece sugerir que la existencia de vías activas de diferenciación no es algo inherente a estas células sino que probablemente es debido a un hábito adquirido al cultivarse de manera continuada con butirato. Las células BCS-TC2.BR provienen de las células BCS-TC2.BR2 y si la diferenciación espontánea fuese algo intrínseco a ellas, las células BCS-TC2.BR deberían mantener esta característica y, sin embargo, no la presentan. Por tanto, el hecho de que las células BCS-TC2.BR2 sufran una diferenciación "espontánea" presumiblemente es debido a que el butirato se elimina justo en el momento de empezar el ensayo, con lo cual parte de él o de sus efectos puede quedar remanente o activo en el interior de la célula. Además, la activación o desactivación de los procesos de diferenciación no es algo inmediato cuando se adiciona o se elimina el agente inductor sino que paulatinamente se va disparando o atenuando. Por otro lado, las células BCS-TC2.BR se diferencian por acción del butirato de acuerdo con la actividad de fosfatasa alcalina que alcanzan, que es mayor que la de las células BCS-TC2; sin embargo, este mayor grado de diferenciación, al igual que ocurre en las células BCS-TC2.BR2, no desencadena el proceso de apoptosis.

4.4 PROLIFERACIÓN *IN VIVO* Y FORMACIÓN DE ESFEROIDES

4.4.1 Capacidad tumorigénica

El hecho de que existan células que respondan de forma diferente a los efectos apoptóticos del butirato, indica que este agente podría seleccionar células con mayor potencial maligno, lo que ha permitido sugerir un posible papel de este ácido graso como promotor tumoral (Paraskeva y col., 1990). De acuerdo con ello, un aspecto importante a delimitar es si las células seleccionadas con butirato muestran diferencias en el potencial maligno respecto a las células parentales. Así, se ha evaluado la capacidad tumorigénica *in vivo*, inyectando subcutáneamente las células BCS-TC2, BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.BR en ratones atímicos. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 26. No se ha observado formación de tumores en ninguno de los ratones inyectados con las células parentales. Este resultado corrobora los estudios que ponen de manifiesto la capacidad tumorigénica prácticamente nula de estas células (Turnay y col., 1990; López-Conejo y col., 1996). Sin embargo, a diferencia de las células parentales, las células resistentes a butirato son capaces de inducir la formación de tumores *in vivo*, siendo la incidencia del 100% en ambos casos. Como se observa en la figura 26, tras un tiempo de latencia de aproximadamente 2 semanas, se empieza a apreciar un rápido crecimiento tumoral, llegando a obtenerse tumores que alcanzan hasta 0,8 cm de diámetro al cabo de 1 mes. En ninguno de los ratones en los que se desarrollaron tumores se ha apreciado la formación de focos metastáticos.

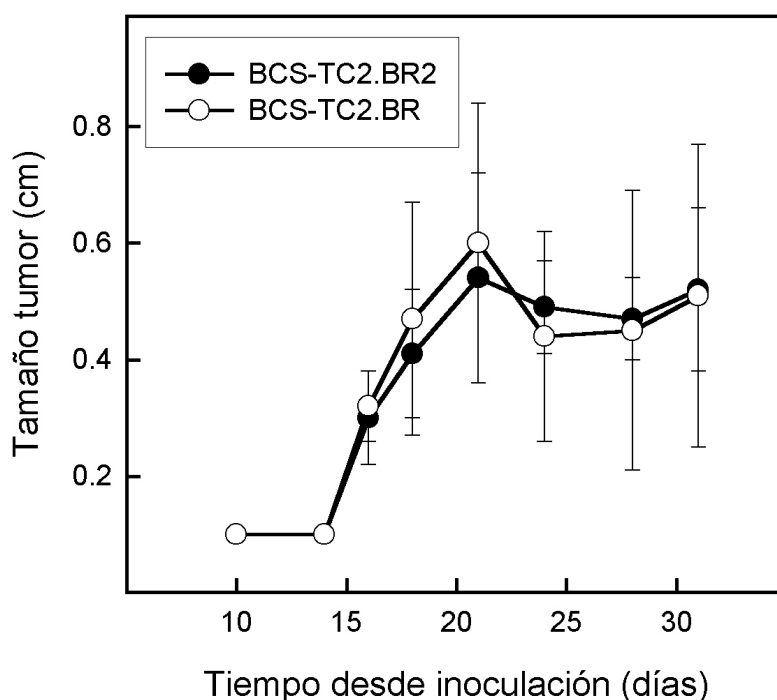


Figura 26.- Evolución del tamaño de los tumores inducidos por las células BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.BR. La tumorigenicidad *in vivo* de las células BCS-TC2.BR2 y BCS-TC2.BR se ha estudiado inyectando subcutáneamente 10^5 células en ratones atímicos. El tamaño de los tumores se mide a distintos tiempos desde la inoculación de las células como se indica en Materiales y Métodos. Los datos representados corresponden a los promedios (\pm SD) de los 12 ratones empleados en tres experimentos independientes.

Como se ha comentado anteriormente, la coinyección de las células parentales BCS-TC2 con componentes específicos de la matriz extracelular (laminina, fibronectina, matrigel) en ratones atímicos indujo la formación de tumores y permitió seleccionar tras el subcultivo *in vivo* células con capacidad tumorigénica intrínseca (López-Conejo y col., 1996; Tabla VIII). La incidencia, el tiempo de latencia, así como el tamaño de los tumores formados a partir de las células BCS-TC2.BR y BCS-TC2.BR2 son muy similares a los obtenidos para estas subpoblaciones tumorigénicas. La selección de una población tumorigénica no es un proceso que necesariamente tenga que producirse *in vivo*, sino que también puede ocurrir *in vitro*, como en el caso de las células resistentes a butirato. Así, este agente ha permitido la selección de clones tumorigénicos o ha modificado a determinadas células induciendo un fenotipo más maligno. Sin embargo, otros datos sugieren que la selección de células resistentes a butirato no es el único factor determinante en la adquisición del fenotipo tumorigénico ya que las células AA/C1/SB no son tumorigénicas aunque, su resistencia a butirato facilita la posterior transformación con carcinógenos dando lugar a células con capacidad tumorigénica (Williams y col., 1990). Por otra parte, la resistencia a butirato no confiere inequívocamente mayor capacidad tumorigénica ya que las células LS174T-D, obtenidas por selección con este agente, presentan menor capacidad tumorigénica *in vivo* (tumores de $0,1 \text{ cm}^3$) que las células parentales ($2,6 \text{ cm}^3$) a los 16 días de la inoculación (Ho y col., 1994).

4.4.2 Expresión de metaloproteinasas de la matriz

Múltiples estudios, en líneas celulares y en tumores, indican que la capacidad maligna de las células se relaciona con la actividad de metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Estas enzimas son capaces de degradar gran número de componentes de la matriz extracelular y participan en numerosos procesos durante la progresión tumoral. Así, facilitan el establecimiento y crecimiento del tumor primario, modulan la neovascularización de los tumores y su presencia es fundamental para que tenga lugar el proceso de invasión y metástasis (McCawley y Matrisian, 2000). Estudios previos indicaban que mientras las células BCS-TC2 no presentan actividad gelatinolítica, ésta se observaba en las subpoblaciones tumorigénicas (López-Conejo y col., 1995). Con estos antecedentes y dada la capacidad tumorigénica intrínseca de las células resistentes a butirato, se considera interesante determinar si este incremento en la expresión de MMPs se correlaciona con el fenotipo tumorigénico. Por otro lado, también resulta interesante determinar si el butirato modifica los niveles de dichas enzimas en los distintos tipos de células. Por ello, la incubación con medio sin suero para la obtención de los correspondientes medios condicionados se ha realizado tanto en presencia como en ausencia de butirato.

Cuando se analiza la actividad gelatinolítica de los medios condicionados de las distintas células fundamentalmente se visualiza una banda de degradación en torno a los 92 kDa (Figura 27). Dicha actividad proteolítica podría corresponder a la forma precursora de la MMP-9, que se detectaría en el zimograma puesto que se ha descrito que las formas precursoras sufren un proceso de autoactivación por su parcial y reversible desnaturalización tras el tratamiento con SDS (Springman y col., 1990).

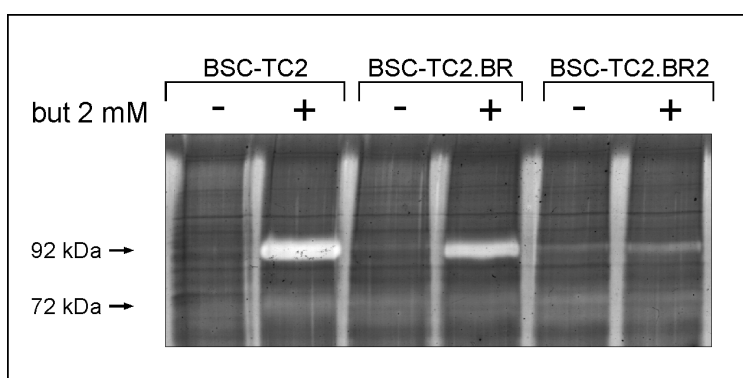


Figura 27.- Efecto del butirato en las actividades gelatinolíticas presentes en el medio condicionado por las distintas líneas celulares.

El medio condicionado en ausencia (-) o presencia (+) de butirato 2 mM, se obtiene como se describe en Materiales y Métodos. Se aplicaron 10 µg de proteína por pocillo en geles de poliacrilamida (10%) polimerizados en presencia de SDS y conteniendo gelatina al 0,1%, llevándose a cabo la zimografía como se indica en el apartado correspondiente.

Como se puede apreciar en la figura 27, los niveles de actividad gelatinolítica en ausencia de butirato son prácticamente indetectables, siendo ligeramente superiores en las células BCS-TC2.BR2. Sin embargo, el butirato incrementa considerablemente la actividad

gelatinolítica siendo éste mayor en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR que en las células BCS-TC2.BR2. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que estas células se cultivan de manera continuada en presencia de este agente y los estímulos producidos por el butirato podrían estar contrarrestados o atenuados por haberse habituado las células a crecer en presencia del mismo. Por otro lado, la actividad de MMP-2 es prácticamente indetectable no observándose diferencias significativas entre los distintos tipos de células ni por la presencia o ausencia de butirato en el medio de cultivo.

Estos resultados indican que en estas células, la actividad de MMP-2 y MMP-9 *in vitro* no resulta imprescindible para manifestar un fenotipo tumorigénico. En lo que respecta a la modulación de las MMPs por butirato se conoce muy poco. De hecho, en lo que se refiere a la MMP-9, existen pocos estudios, no muy concluyentes y con resultados contradictorios. Así, en células transformadas de colon de rata DHD/K12, el butirato disminuye la actividad de la MMP-9 (Aparicio y col., 1998), aunque las altas concentraciones de butirato utilizadas en este ensayo podrían estar desfigurando el resultado por un posible efecto citotóxico sobre las células. Sin embargo, en células tumorales de colon SW 1116, el butirato incrementa la actividad de la MMP-9 (Emenaker y Basson, 1998) lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos para las células BCS-TC2, aunque en su caso el incremento producido es considerablemente inferior. Estos resultados podrían sugerir que el butirato actuaría como promotor de invasión y metástasis al estimular la producción de MMP-9, no obstante, estos autores comprueban que la capacidad invasiva *in vitro* de las células SW 1116 disminuye debido a que el butirato estimula, no solo la MMP-9, sino también la producción de inhibidores específicos de las MMPs (TIMP1 y 2), prevaleciendo el efecto de éstos sobre el de la MMP-9. A diferencia de la MMP-9, la actividad de MMP-2 no se modifica con la presencia de butirato en los medios condicionados de las células SW 1116 de colon (Emenaker y Basson, 1998) lo que estaría de acuerdo con los datos obtenidos.

Recientemente se ha descrito que en células mesenquimales de intestino, el butirato induce la expresión de estromelisina-1 en células estimuladas con IL-1 o TNF- α . En estas condiciones, la expresión de MMP-9 disminuye por acción del butirato mientras que la MMP-2 no se modifica. Además, esta regulación está condicionada por los cambios producidos por el butirato en la acetilación de histonas (Pender y col., 2000). La evaluación de la actividad en los medios condicionados para degradar caseína puede ser indicativa también de la presencia de actividades de otras MMPs, por ejemplo la estromelisina-1. Sin embargo, la realización de caseinogramas conlleva distintos problemas técnicos que dificultan su interpretación (Fernández-Resa y col., 1995). En cualquier caso, los resultados obtenidos aunque permiten sugerir la existencia de distintas bandas de degradación en torno a 45-65 kDa que podrían estar causadas por la subfamilia de las estromelisininas, no son concluyentes. Los estudios mediante análisis de los medios condicionados tras transferencia electroforética e inmunodetección con anticuerpos frente a la estromelisina-1 no han permitido detectar la expresión de esta proteína ni siquiera en presencia de butirato.

La estromelisina-3 es una metaloproteinasas que se sobreexpresa en carcinomas humanos, entre ellos en adenocarcinoma de colon (Noël y col., 1996; Undén y col., 1996; Mueller y col., 1997). Esta enzima se clasificó como un miembro de la familia de las MMPs

basándose en el alto grado de homología de secuencia (Basset y col., 1990); sin embargo, hasta el momento solo se ha conseguido identificar a la α 2-macroglobulina como único sustrato. Además, su expresión parece estar restringida exclusivamente a las células del estroma adyacentes a las células tumorales (Basset y col., 1997). Sin embargo, estudios previos mediante el empleo de distintos anticuerpos específicos frente a la estromelisina-3 sugerían que las células BCS-TC2, pese a ser de naturaleza epitelial, expresaban esta proteína. Para verificar este resultado se analizó la expresión de estromelisina-3 en las distintas líneas celulares mediante RT-PCR. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 28. Como se puede observar, la presencia de una única banda del tamaño esperado (502 pb) confirma la expresión de estromelisina-3 en estas células. La expresión de esta proteína en células epiteliales resulta inesperada puesto que, aunque esta proteína está anormalmente elevada en numerosos tipos de cáncer (Okada y col., 1995; Têtu y col., 1998; Thewes y col., 1999), sin embargo, prácticamente se ha considerado como dogma que su expresión está limitada a las células del estroma tumoral (Basset y col., 1997). Sin embargo, su expresión por RT-PCR se ha detectado en ciertas líneas celulares de carcinoma, entre ellas en las células SW620 de adenocarcinoma de colon, aunque en dichas células su expresión es muy baja. Únicamente en células de carcinoma pancreático se ha podido detectar tanto mRNA como proteína (von Marschall y col., 1998). En estos estudios no se discute acerca de las características fenotípicas de estas células, sin embargo en otros estudios realizados con células de carcinoma de mama también se ha detectado expresión de estromelisina 3 lo que se justifica como consecuencia de un proceso de dediferenciación epitelio-mesénquima, tratándose de células que aún siendo de origen epitelial (citoqueratinas positivas) también expresan marcadores mesenquimales tales como vimentina (Ahmad y col., 1998). Este hecho no sería el responsable de la expresión de estromelisina-3 en las células BCS-TC2 y en las sublíneas obtenidas a partir de ellas, ya que como se ha comentado anteriormente, en estas células no se ha observado ese proceso de dediferenciación (Figura 14).

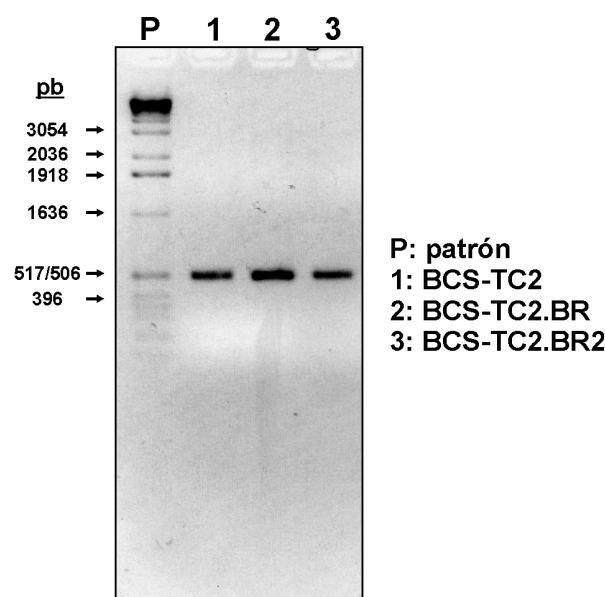


Figura 28.- Amplificación mediante RT-PCR de la estromelisina 3 presente en las distintas líneas celulares. En la figura se muestra la electroforesis en geles de agarosa al 2% de los productos amplificados por RT-PCR usando cebadores específicos para la estromelisina 3 humana; el producto obtenido, después de 35 ciclos, es una única banda de 502 pb. La figura es el negativo del gel obtenido tras tinción con bromuro de etidio.

Además, como se observa en la figura 29, en estas células también es posible detectar la presencia de proteína en el medio condicionado. En todos los casos se aprecia que el anticuerpo utilizado (Mab 5ST-4A9) reconoce tres bandas proteicas de aproximadamente 52, 48 y 35 kDa. La estromelisina-3 se expresa como una proenzima de aproximadamente 52 kDa y, al igual que ocurre con otras MMPs, presenta formas procesadas. La proteína de 48 kDa corresponde a la forma activa y es la única capaz de romper la α 2-macroglobulina (Mari y col., 1998). Mientras que la proteína de 35 kDa corresponde a la forma truncada de la estromelisina-3 activa y carece de parte del dominio catalítico, lo que le impide presentar actividad frente a la α 2-macroglobulina (Mari y col., 1998).

En ausencia de butirato, se detectan mayores niveles de proteína, fundamentalmente de la forma procesada de 35 kDa, en los medios condicionados por las células BCS-TC2.BR y BCS-TC2.BR2 respecto del de las células BCS-TC2 (Figura 29). Esta forma de la proteína, como se pone de manifiesto en la descripción de las características del anticuerpo (Santavicca y col., 1995), no siempre se visualiza y se ha sugerido que surge por un mecanismo desconocido que requiere la presencia del factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) en el medio de cultivo (Mari y col., 1998). Este hecho podría indicar que estas células secretan dicho factor de crecimiento y que las células resistentes a butirato podrían hacerlo en mayor medida. Asimismo, mientras que en ausencia de butirato, se aprecian fundamentalmente las formas procesadas de 48 y 35 kDa en su presencia se observa un claro incremento tanto de la forma precursora como de las formas procesadas (Figura 29). Además, al igual que en el caso de la MMP-9, el efecto es más acusado en aquellas células que crecen de manera habitual en ausencia de butirato.

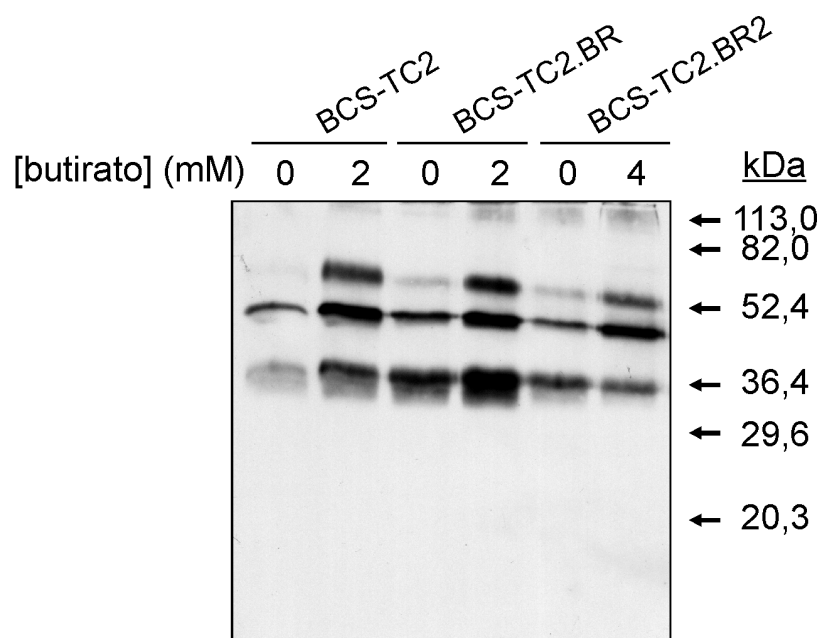


Figura 29.- Efecto del butirato en los niveles de estromelisina 3 secretados por los distintos tipos celulares. 10 μ g de proteína de los medios condicionados, recogidos en presencia o en ausencia de butirato, se analizan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (15%) en presencia de SDS. La transferencia a membranas de nitrocelulosa y la inmunodetección se realizan como se indica en Materiales y Métodos. El anticuerpo anti-estromelisina 3 se emplea a una dilución 1/10.000 y el anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa a 1/5.000. El revelado se lleva a cabo empleando reactivos de ECL.

La modulación de la estromelisina-3 y la MMP-9 por butirato podría tener importancia *in vivo*. En este sentido se ha descrito que el butirato modula la inflamación intestinal a través de la secreción de estromelisina-1 por células estimuladas del estroma (Pender y col., 2000). En este caso, sería mas importante en las células resistentes a los efectos apoptóticos del agente donde podría actuar como un inductor de la progresión tumoral al incrementar la expresión y activación de estas proteasas. Es decir, el butirato *in vivo* no actuaría solo favoreciendo la proliferación de las células que escapan a su control, sino que además, promovería la expresión de distintas MMPs lo que podría favorecer su capacidad invasiva. En este sentido, se ha descrito que el butirato induce también la expresión y actividad del activador de plasminógeno de tipo tisular (Arts y col., 1995); éste convierte el plasminógeno en plasmina que, a su vez, es capaz de procesar distintas MMPs y, por tanto, el balance de MMPs activas sería mayor, así como sus efectos. No obstante, hay que tener en cuenta que las MMPs, son inhibidas específicamente por los TIMPs (Pei y Weiss, 1995) y, como se ha comentado anteriormente, la expresión de éstos puede inducirse por butirato (Emenaker y Basson, 1998), por lo que habría que tener en cuenta el balance total de expresión y activación de todo un conjunto muy variable de proteínas.

4.4.3 Formación de esferoides

Una cuestión crítica planteada cuando se utilizan líneas celulares como material biológico es determinar bajo qué condiciones experimentales las células tumorales *in vitro* pueden reflejar mejor las propiedades de un tumor *in vivo*. Aunque es difícil extrapolar resultados entre ambos sistemas, el cultivo tridimensional de los esferoides multicelulares parece ser un modelo experimental muy útil, de complejidad intermedia entre el crecimiento en monocapa *in vitro* y la formación de tumores sólidos *in vivo*, para estudios sobre tumorigénesis (Kunz-Schughart, 1999; Santini y Rainaldi, 1999). De hecho, en estudios *in vitro* centrados en el efecto de drogas o de radiación sobre células en cultivo, cuando es posible, también se analizan estos efectos sobre los esferoides multicelulares (Buffa, 2001; Larsen y col., 2001) y se han propuesto como un sistema modelo adecuado para medir el crecimiento de tumores (Chignola, 2000). Sin embargo, hay que tener en cuenta que no todas las líneas celulares que crecen en monocapa son capaces de crecer en suspensión o bajo la forma de esferoides (Rainaldi y col., 1999). Se denomina esferoide a todo agregado de células, normalmente con una dimensión superior a los 100 μ m, que aumenta de tamaño progresivamente durante su cultivo en suspensión (Desoize y col., 1998; Fracasso y Colombatti, 2000). En este sistema, el crecimiento tridimensional de las células favorece las interacciones célula-célula y crea microentornos que simulan a los que se encuentran en el tumor (Santini y Rainaldi, 1999). Se han desarrollado programas computerizados de modelización que describen el crecimiento de tumores aplicando los datos obtenidos en los esferoides (Düchting y col., 1996). Estos modelos pueden ser muy útiles en el tratamiento de pacientes ya que permiten evaluar el efecto de protocolos radioterapéuticos en el crecimiento de esferoides y tumores.

En las etapas iniciales del establecimiento de la línea BCS-TC2 se observó que, tanto a partir de los explantes como de las regiones donde las células crecían en multicapa, se desprendían células que permanecían en suspensión con capacidad para formar agregados o esferoides. Esta característica se mantenía durante su subcultivo *in vitro*, lo que permitió el establecimiento de una subpoblación celular del tumor que, de forma no inducida, crece formando organoides o esferoides espontáneos (Figura 30 A). Estas células se denominaron BCS-TC3 (Turnay, 1989; López de Silanes y col., 1998).

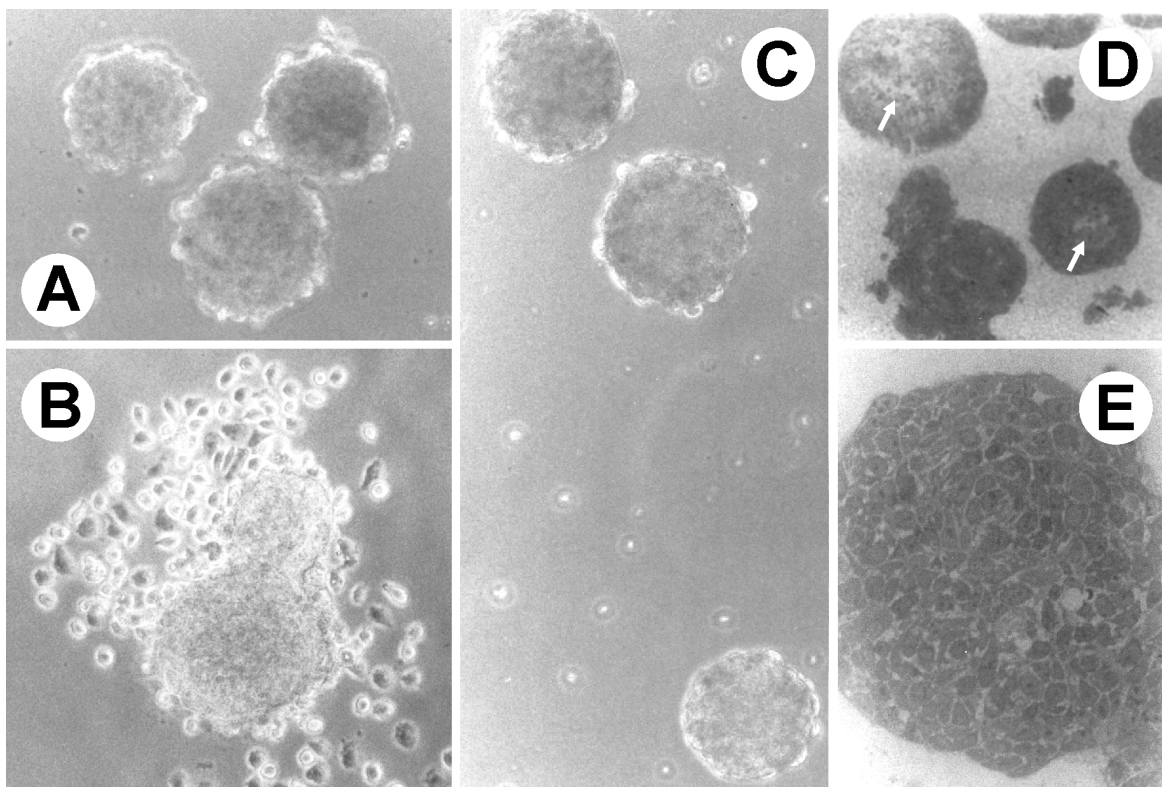


Figura 30.- Morfología de los esferoides espontáneos e inducidos.

(A) Esferoides espontáneos de células BCS-TC3, (B) esferoides inducidos de células BCS-TC2, (C) esferoides inducidos de células BCS-TC2.BR2, (D y E) cortes semifinos de esferoides de células BCS-TC3. Las zonas de necrosis aparecen marcadas.

En células adherentes como las BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2, cuando se bloquea la adhesión al soporte de cultivo, se favorece la formación de contactos célula-célula y se induce el crecimiento bajo la forma de esferoides. El método utilizado para inducir la formación de esferoides en este tipo de células consiste en la siembra de las células sobre un sustrato o soporte de crecimiento no adherente; por ejemplo, sobre un lecho de agar (Yuhás y col., 1977; Santini y col., 1999). De esta forma, al impedir que la célula se una al sustrato, se favorecen

las interacciones célula-célula y se observa que, aproximadamente a las 24-48 horas, las células interaccionan unas con otras formando agregados no muy compactos, mientras que un número reducido de células individuales permanecen remanentes en suspensión. Pasados unos días, estos agregados adquieren una estructura más organizada, dando lugar a formas redondeadas compuestas por un elevado número de células compactadas en las que es difícil distinguir de manera individual unas células de otras (Figura 30 B y C). En el caso de las células BCS-TC2, se puede llegar a observar adhesión al soporte de cultivo a tiempos largos o tras su siembra en placas de cultivo adherente (Figura 30 B). En la obtención de esferoides de otras líneas celulares se han descrito cambios similares (Olea y col., 1994; Djordjevic y col., 1998; Rainaldi y col., 1999). De este modo, la estructura tridimensional formada se asemeja a la que se encuentra en los tumores, sobre todo en lo que respecta a contactos célula-célula y comunicaciones celulares (Santini y col., 1999).

Curvas de proliferación de los esferoides

El tiempo necesario para alcanzar un diámetro de alrededor de 100 μ m, para definir las asociaciones celulares como esferoides, depende del número de células sembradas. A mayor densidad celular en la suspensión inicial, la formación de los esferoides es más rápida; sin embargo, a menor densidad de siembra, el tamaño de los esferoides es más homogéneo. En algunos casos, se pueden formar espontáneamente nuevos esferoides cuando éstos alcanzan un tamaño superior a 1 mm. Estos nuevos esferoides surgen, probablemente, a partir de células individuales que se separan de los agregados iniciales o de la fragmentación de los esferoides que han alcanzado un determinado tamaño, formándose asociaciones de células irregulares. Las dinámicas de crecimiento de los tumores sólidos, se caracterizan por una fase temprana exponencial seguida de un período de crecimiento ralentizado (McCredie y col., 1965). Cuando se analiza el crecimiento o la evolución de los esferoides inducidos procedentes de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 y de los esferoides espontáneos (células BCS-TC3), se obtienen las curvas de proliferación que se muestran en la figura 31.

El tiempo de duplicación de los dos tipos de esferoides inducidos, calculado a partir de las velocidades de crecimiento, es considerablemente mayor que el de las células creciendo en monocapa, siendo de 4 y 12 días para los esferoides de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 respectivamente, frente a las 32-45 horas para las células creciendo en monocapa. Sin embargo, el tiempo de duplicación de los esferoides de las células BCS-TC3 es de 28 días. Tanto las curvas de crecimiento como los tiempos de duplicación de los esferoides inducidos son muy similares a los descritos para otras líneas celulares (Soranzo y col., 1986; Senekowitsch-Schmidtke, 1999; Lehnert y col., 1999) aunque se han descrito tiempos de hasta 32-48 horas para esferoides formados a partir de las células MCF7 (Olea y col., 1994). La diferencia entre el crecimiento en monocapa o en esferoides se ha sugerido que podría estar relacionada con cambios en el área superficial de los esferoides, propiedades de la membrana o incrementos en la duración del ciclo celular cuando prevalecen las interacciones célula-célula (Sutherland y col., 1984; Green y col., 1999). Sin embargo, estudios de marcaje con timidina tritiada indican que la duración de la fase S no se modifica en los esferoides

(Carlsson, 1977); por lo que, más que cambios en el ciclo celular, el incremento en el tiempo de duplicación en los esferoides se puede atribuir a un mayor número de células quiescentes y a un incremento en células muertas en el área interna por inaccesibilidad de nutrientes (Desoize y col., 1998).

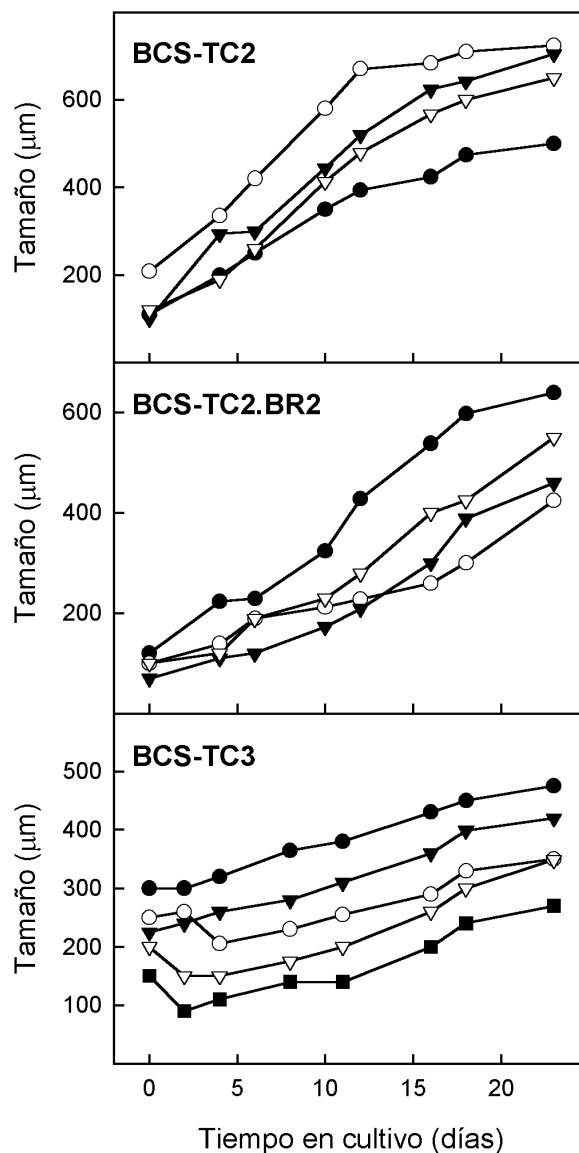


Figura 31.- Curvas de proliferación de los esferoides inducidos y espontáneos.

Se siembran 10^6 células BCS-TC2, BCS-TC2.BR2 o BCS-TC3 en placas no adherentes de 10 cm de diámetro. A los 3 días, los esferoides formados se someten a una dilución límite y se resiembran en placas de 24 pocillos para poder seguir la evolución del crecimiento de cada uno de los esferoides de manera individual. El crecimiento de los esferoides se evalúa cada 2 días utilizando un ocular calibrado. El tamaño se calcula a partir de la raíz cuadrada del producto de los diámetros perpendiculares del esferoide. Se representan las curvas de crecimiento individual de varios esferoides significativos.

Cuando las dimensiones del esferoide son grandes, el crecimiento es muy lento y se ha propuesto que se produce la estructuración de la región interna, formándose un centro necrótico. La inducción de este área necrótica en el centro del esferoide se genera por los gradientes de oxígeno, pH y nutrientes y se asemeja a la estructura de los tumores (Dubessy, 2000). Por otra parte, como ya se ha comentado, cuando los esferoides de BCS-TC2 se resiembran en placas adherentes, sólo mantienen este tipo de crecimiento durante 2 ó 3 días. Transcurrido el cual, como ocurre en otras células de adenocarcinoma de colon (Soranzo y col., 1986), se establecen de nuevo contactos con el sustrato, prevaleciendo las interacciones célula-sustrato, lo que les permite adherirse y proliferar de nuevo formando monocapas. Sin embargo, el comportamiento de los esferoides de las células BCS-TC3 y de los de las BCS-TC2.BR2 es diferente, mantienen de forma continuada su crecimiento en suspensión. Tras el cultivo prolongado de éstos se observa la adhesión de unos esferoides a otros y, sólo muy esporádicamente, muestran capacidad para adherirse al sustrato. En el caso de los esferoides de las células BCS-TC3, éstos son muy resistente a la disgregación; sólo tras una tripsinización exhaustiva se consigue desorganizarlos y disgregarlos. La suspensión celular resultante se adhiere poco al sustrato y se pierde viabilidad celular indicando la importancia de los contactos célula-célula para el mantenimiento del crecimiento celular, poniéndose de manifiesto las diferencias fenotípicas entre esferoides inducidos y espontáneos. Sin embargo, en otras líneas celulares, la viabilidad celular de esferoides tras el proceso de disgregación no disminuye (Rainaldi y col., 1999; Lehnert y col., 1999).

Para determinar cómo se asocian las células en los esferoides, se han realizado estudios de microscopía electrónica de transmisión con los esferoides de células BCS-TC3. En el examen de distintas secciones semifinas (Figura 30 D y E) se ha observado que, a partir de un determinado tamaño, la zona central de los esferoides aparece necrosada. La formación de estas áreas depende de las técnicas utilizadas para el establecimiento de los esferoides, del tamaño que alcanzan y del tiempo que se mantienen en cultivo (Santini y Rainaldi, 1999). El comportamiento observado con los esferoides resulta comparable a la evolución de los tumores inducidos *in vivo* cuando las células BCS-TC2 se coinyectan con matrigel, un extracto de basamentos membranosos. En estos tumores se detecta una zona externa, con un alto porcentaje de células proliferativas (tinción positiva con Ki67), y una zona interna con un elevado grado de necrosis (López-Conejo y col., 1996). En la organización de los esferoides se ha observado una zona compuesta de multicapas celulares, fuertemente empaquetadas, con interdigitaciones y agrupadas formando estructuras de tipo mosaico o asociaciones formando un lumen central y estableciéndose interconexiones celulares estabilizadas por desmosomas. En la región central de los esferoides de mayor tamaño pueden apreciarse desechos celulares y células con cambios degenerativos. Similares características se han descrito en los esferoides LIM 1863 (Thompson y col., 1998). Sin embargo, en las células BCS-TC3 no se han apreciado signos claros de polarización celular, a diferencia de las células LIM 1863 donde aparecen células *globet* y columnares en la cara expuesta al lumen central (Thompson y col., 1998). Esto indicaría un menor grado de diferenciación de las células BCS-TC3.

Estudios de diferenciación celular

El crecimiento de las células bajo la forma de esferoides puede ser un reflejo del grado de diferenciación celular o influir sobre el mismo por lo que se han analizado los niveles de fosfatasa alcalina. En la figura 32 se recoge la actividad de fosfatasa alcalina de las células creciendo en monocapa y como esferoides. Cuando las células proliferan formando esferoides o no se modifica, o se reduce entre 2 y 3 veces la actividad de esta enzima, lo que sería indicativo de un menor grado de diferenciación.

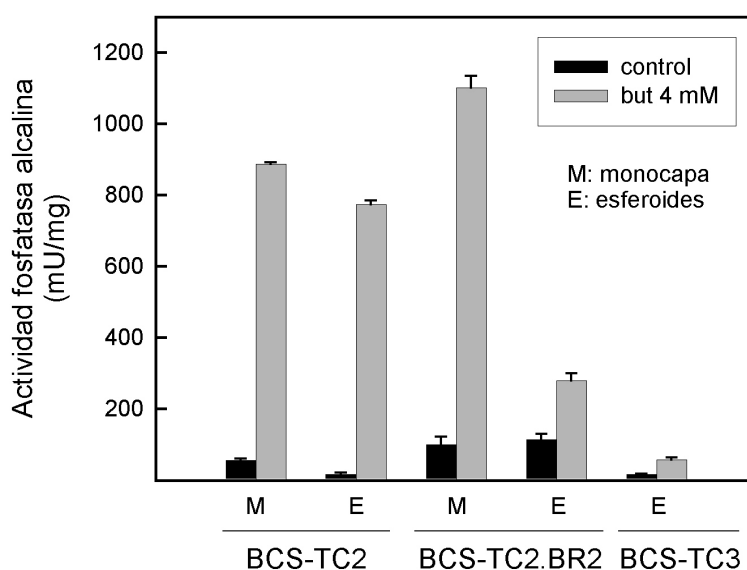


Figura 32.- Efecto del butirato sobre la actividad de fosfatasa alcalina de los esferoides.

La actividad de fosfatasa alcalina se determina 7 días después de la siembra de los distintos tipos de células y de las distintas formas de cultivo (monocapa y esferoides), en ausencia o en presencia de butirato 4 mM. Se representan los valores promedio (\pm SD) de 3 experimentos independientes.

El estudio del efecto del butirato en los esferoides puede dar idea del mecanismo por el cual este agente puede prevenir e inhibir la formación y el crecimiento de tumores *in vivo*, por lo que se pasó a estudiar su efecto en el grado de diferenciación de las células de los esferoides (Figura 32). En cultivos en monocapa, de las células BCS-TC2 y células BCS-TC2.BR2, como ya se ha comentado, se incrementa considerablemente la actividad de fosfatasa alcalina (aproximadamente 30 y 18 veces, respectivamente). En los esferoides inducidos de células BCS-TC2, la actividad de fosfatasa alcalina también se incrementa considerablemente tras el tratamiento con el agente, de 17 a 770 mU/mg, aunque no se llega a alcanzar el valor obtenido con las monocapas celulares (928 mU/mg). Sin embargo, el butirato no produce modificaciones tan acusadas sobre las células de los esferoides de las células BCS-TC2.BR2 ni BCS-TC3. En el caso de las células BCS-TC2.BR2, en monocapa la actividad, tras tratamiento con butirato, se incrementa de 100 a 1100 mU/mg, pero el efecto

sobre los esferoides no es tan acusado (de 115 a 280 mU/mg); en los esferoides espontáneos, no se llega a incrementar la actividad de la fosfatasa alcalina en más de tres veces (de 17,3 a 58,1 mU/mg). Todo ello implicaría una cierta resistencia a butirato. De forma similar, en los esferoides LIM 2412 tampoco se afectan sus niveles de fosfatasa alcalina tras tratamiento con butirato (Thompson y col., 1998). En este sentido, se ha observado que la formación de agregados celulares puede conferir resistencia a tratamientos físicos, como la radiación (Omura y col., 1997; Santini y col., 1999), o químicos, como distintos tipos de drogas (Dunkern y Mueller-Klieser, 1999; Hedlund y col., 1999). La mayor resistencia de los esferoides frente a los cultivos en monocapa indica que el efecto ejercido no sólo es dependiente de la respuesta intrínseca de las células, sino también de otros factores relacionados con la estructura del esferoide. Estas diferencias se han atribuido a que en los esferoides prevalecen los contactos célula-célula (“efecto contacto”), a problemas de difusión y/o penetración de las drogas y a una mayor resistencia de las células hipóxicas del centro necrótico a la radiación (Desoize y col., 1998; Santini y Rainaldi, 1999). El efecto casi nulo ejercido por el butirato sobre los esferoides de células BCS-TC2.BR2 y BCS-TC3 podría estar relacionado con el establecimiento de un mayor número de contactos celulares que dificultarían la permeabilidad o accesibilidad del butirato sin descartar la propia resistencia de las células al efecto de este agente. No obstante, ya que el butirato inhibe la proliferación bloqueando el ciclo celular (Heerdts y col., 1994), podría ser que los efectos ejercidos por este agente sean menores, como consecuencia de la menor velocidad de proliferación de este tipo de esferoides, comparándolos con los de las células BCS-TC2. La identificación de sustancias que puedan revertir la resistencia que presentan los esferoides a distintos agentes, muy similares a las que presentan los tumores sólidos, y el mecanismo de estos procesos es uno de los temas que más se están considerando en estos últimos años (Desoize y Jardillier, 2000).

4.5 RESPUESTA AL ESTRÉS METABÓLICO Y AL ESTRÉS TÉRMICO

Para comprobar si la resistencia a la apoptosis de las células BCS-TC2.BR2 se debe sólo a los efectos del butirato o, por el contrario, es de carácter más general, las células parentales BCS-TC2 y las resistentes BCS-TC2.BR2 se han sometido a otros tipos de estrés celular. Para ello, se han seleccionado: a) un estrés metabólico, provocado por la eliminación de la glucosa del medio de cultivo y, b) un estrés térmico, conseguido por la exposición de las células a temperaturas de 42 y 45°C. En otros sistemas celulares se ha descrito que, en estas dos situaciones, se induce el proceso de apoptosis (Singh y col., 1997; Takasu y col., 1999; Goto y col., 1999).

4.5.1. Efecto de la eliminación de la glucosa del medio de cultivo

Inducción de apoptosis

Las células transformadas proliferan *in vitro* generalmente en medios de cultivo ricos en glucosa (1-4,5 g/l; 0,5-25 mM), constituyendo esta molécula la principal fuente de energía

para las células. Por ello, la eliminación de la glucosa del medio de cultivo puede constituir una acción estresante sobre el cultivo celular. Para estos estudios, las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 se cultivan en idénticas condiciones, es decir, las células BCS-TC2.BR2 se mantienen en medio de cultivo carente de butirato. Como se observa en la figura 33, a las 24 horas de haber eliminado la glucosa se observa una pérdida considerable de la viabilidad celular. Este efecto es más acusado en las células BCS-TC2 las cuales, cuando crecen en presencia de glucosa están adheridas a la superficie y bien extendidas (Figura 33 A). Sin embargo, al retirar la glucosa, se observa un número elevado de células redondeadas que se levantan de la monocapa (Figura 33 B), detectándose en el medio de cultivo abundantes células no adheridas.

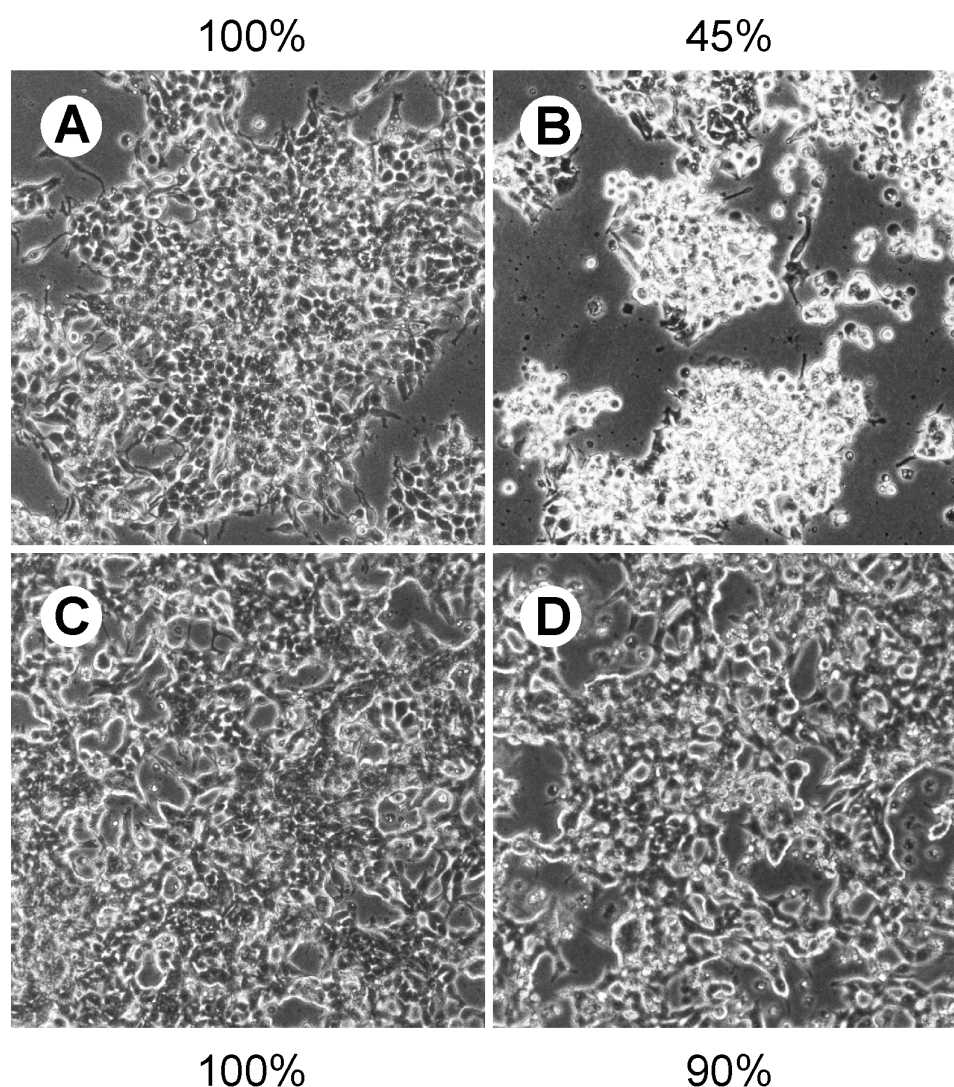


Figura 33.- Efecto de la eliminación de la glucosa del medio en la morfología y viabilidad celular.

En A y C se muestra el aspecto de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 proliferando en presencia de glucosa y, en B y D las mismas células cultivadas durante 24 horas en ausencia de glucosa. En cada caso se indica la viabilidad obtenida para cada uno de los cultivos, determinada por el método del MTT, según se describe en Materiales y Métodos, y referida a la de las células proliferando en presencia de glucosa (100%).

Cuando se consideran las células BCS-TC2.BR2, estos efectos no son tan acusados, si bien hay diferencias morfológicas con las células cultivadas en presencia de glucosa (Figura 33 C y D). En otras líneas celulares se han observado efectos similares tras la eliminación de la glucosa (Lee y col., 1997; Singh y col., 1997; Takasu y col., 1999; Tey y col., 2000); en concreto, en distintas líneas celulares de adenocarcinoma de colon, se ha descrito que se producen incrementos de 2 a 3,5 veces en el número de células liberadas al medio cuatro días después de eliminar la glucosa (Singh y col., 1997).

A la vista del daño celular provocado por la eliminación de la glucosa, se ha analizado si en estas condiciones se desencadena el proceso de apoptosis. Mediante citometría de flujo, utilizando como sonda la anexina V-FITC, se han obtenido resultados indicativos de que se produce apoptosis en los cultivos (Figura 34). Aunque la supresión de la glucosa induce apoptosis en ambas líneas celulares de una manera dependiente del tiempo de tratamiento, ésta se produce con distinta magnitud según se trate de las células BCS-TC2 o BCS-TC2.BR2. A las 12 horas después de haber retirado la glucosa, el porcentaje de las células apoptóticas en los cultivos de las células parentales se incrementa 2,3 veces mientras que sólo lo hace 1,5 veces en las células BCS-TC2.BR2. Este efecto es más acusado a las 24 horas, siendo más del doble el incremento del porcentaje de apoptosis en las células BCS-TC2 respecto a las células BCS-TC2.BR2 (4,8 frente a 2,2, respectivamente). Esto pone de manifiesto la mayor resistencia a la inducción de apoptosis de las células BCS-TC2.BR2 frente a un estímulo diferente y, por tanto, parece sugerir que la resistencia de estas células podría tener un carácter más general y no ser sólo un efecto específico frente al butirato.

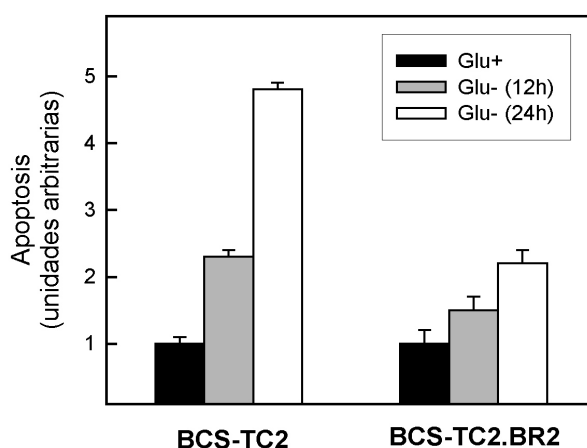


Figura 34.- Inducción de apoptosis por eliminación de la glucosa en el medio de cultivo.

Se siembran $7,5 \times 10^5$ células en placas de cultivo de 10 cm de diámetro, en medio DMEM completo. Cuando las células se encuentran subconfluentes, se cambia el medio y se añade medio fresco con glucosa (4,5 g/l; Glu+) o sin glucosa (Glu-), manteniéndose en estas condiciones durante 12 ó 24 horas. Tras ello, las células se tripsinizan y se preparan para la valoración por citometría de flujo, como se indica en Materiales y Métodos. Para cuantificar la apoptosis se asigna el valor de 1 al porcentaje de células que unen anexina V-FITC en las células de los correspondientes cultivos en presencia de glucosa.

La eliminación de la glucosa induce también apoptosis en otros sistemas celulares (Singh y col., 1997; Takasu y col., 1999), aunque no siempre se produce de este modo. Por ejemplo, en células neuronales, la muerte celular cursa como una combinación de necrosis y apoptosis (Cavaliere y col., 2001); en células leucémicas, mientras que la eliminación de glutamina provoca apoptosis, la retirada de la glucosa del medio desencadena necrosis (Petronini y col., 1996). Parece, además, que la entrada en apoptosis tras la eliminación de la glucosa provoca un incremento en la expresión de *c-myc* en fibroblastos, en linfoblastos, y en células de carcinoma hepático y de mama (Lee y col., 1997; Shim y col., 1998) y que ésta se puede prevenir por sobreexpresión de Bcl-2 (Lee y col., 1997) o, como ocurre en células neuronales por un aumento en la expresión de la proteína HSP 70 (Cavaliere y col., 2001).

Por otro lado, distintos estudios relacionan la mayor resistencia a la apoptosis inducida por la eliminación de la glucosa con una mayor malignidad de las células; las células que presentan mayor resistencia a apoptosis son las que exhiben una mayor capacidad tumorigénica. Así, el clon metastático A11 presenta mayor resistencia a distintos estreses microambientales (eliminación de suero o glucosa del medio o situaciones de hipoxia) que las células P29 con bajo potencial metastático (Takasu y col., 1999).

Actividad de caspasas

El diferente grado de inducción de apoptosis por eliminación de glucosa en ambas líneas celulares podría reflejarse en una modificación de la actividad de las caspasas, principales ejecutoras del programa de apoptosis. Por ello, se ha analizado la actividad de las caspasas 9 y 3, empleando sustratos específicos para cada una de ellas. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 35. La actividad de la caspasa 9 se eleva en las dos líneas celulares cuando se cultivan en ausencia de glucosa, aunque no se produce con igual intensidad (un incremento de 2,4 veces en las células BCS-TC2 frente a 1,3 en las BCS-TC2.BR2). En cuanto a la actividad de la caspasa 3, se produce un ligero incremento de 1,2 veces en las células BCS-TC2 cuando se elimina la glucosa, mientras que en las células BCS-TC2.BR2 prácticamente no se produce modificación.

Los conocimientos actuales sobre la actuación de la caspasa 9 la sitúan, fundamentalmente, en la vía apoptótica en la que se producen daños mitocondriales. Es una de las caspasas iniciadoras y su activación requiere la interacción con el citocromo c y con la proteína Apaf1, proteínas mitocondriales que se liberan al citoplasma al producirse daño mitocondrial (Li y col., 1997). Una vez activada, la caspasa 9 tiene capacidad para procesar a otras caspasas ejecutoras, entre ellas la caspasa 3 (Li y col., 1997). Esta última, a su vez, puede activar a otras caspasas generando un ciclo de amplificación (Srinivasula y col., 1996b), o bien es capaz de actuar sobre componentes estructurales claves en el citoesqueleto y en el núcleo, así como sobre numerosas proteínas que participan en las rutas de señalización; todo ello desencadena las etapas finales del proceso de apoptosis (Takahashi y col., 1996; Kamada y col., 1998; Zhang y col., 1998). Teniendo en cuenta estos datos, el hecho de que la eliminación de la glucosa provoque un mayor incremento en la actividad de ambas caspasas

en las células BCS-TC2 corrobora los datos de unión de anexina V-FITC obtenidos mediante citometría de flujo (Figura 34).

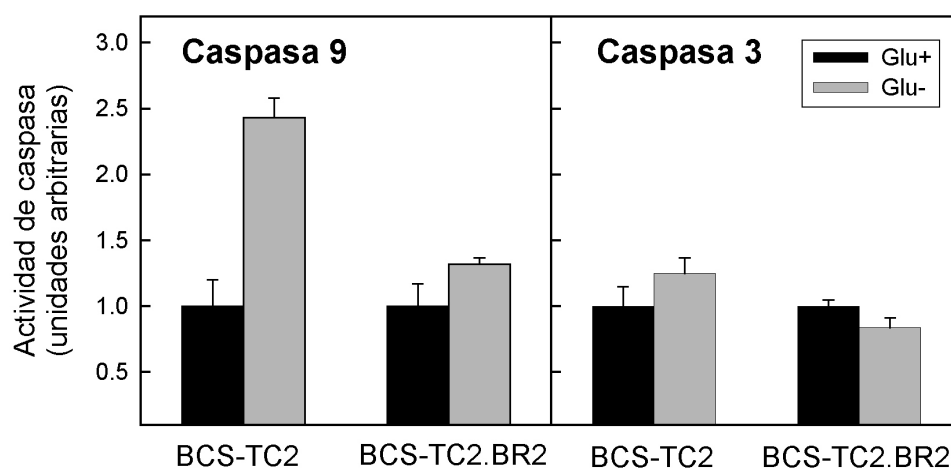


Figura 35.- Efecto de la eliminación de la glucosa en la actividad de las caspasas 9 y 3.

Se siembran $7,5 \times 10^5$ células en placas de cultivo de 10 cm de diámetro, en medio DMEM completo. Cuando el cultivo se encuentra subconfluyente, se cambia el medio y se añade medio fresco con 4,5 g/l de glucosa (Glu+) o medio sin glucosa (Glu-). Tras mantener las células en estas condiciones durante 24 horas, los cultivos se tripsinizan y se procesan para evaluar la actividad de las caspasas 9 y 3 como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados son la media (\pm SD) de dos experimentos.

El butirato como fuente alternativa de energía

La eliminación de la glucosa del medio de cultivo de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 induce apoptosis. Por otro lado, *in vivo*, el butirato constituye la principal fuente de energía para las células del epitelio colónico. Por tanto, se ha planteado la cuestión de si al eliminar la glucosa de los medios de cultivo, el butirato puede ser utilizado como fuente alternativa de energía evitando que se desencadenen los procesos que conducen a la muerte celular. Para analizar este aspecto, se ha estudiado como evolucionan las curvas de proliferación bajo distintas condiciones, presencia o ausencia de glucosa y/o butirato en el medio de cultivo; los efectos sobre la proliferación de las células en estas condiciones se han evaluado a lo largo de 10 días (Figura 36).

El descenso observado en la curva de proliferación de ambas líneas celulares tras la eliminación de la glucosa (Figura 36 C y D), reflejo de un menor número de células, debe ser consecuencia de que en el cultivo se está produciendo muerte celular que no es compensada por ciclos de división celular. Este efecto se puede relacionar con el proceso de inducción de apoptosis, comentado anteriormente, producido tras la eliminación de la glucosa. El mantenimiento de los cultivos sin glucosa durante 10 días, termina dañando por igual los cultivos de ambas líneas celulares por la falta de aporte energético.

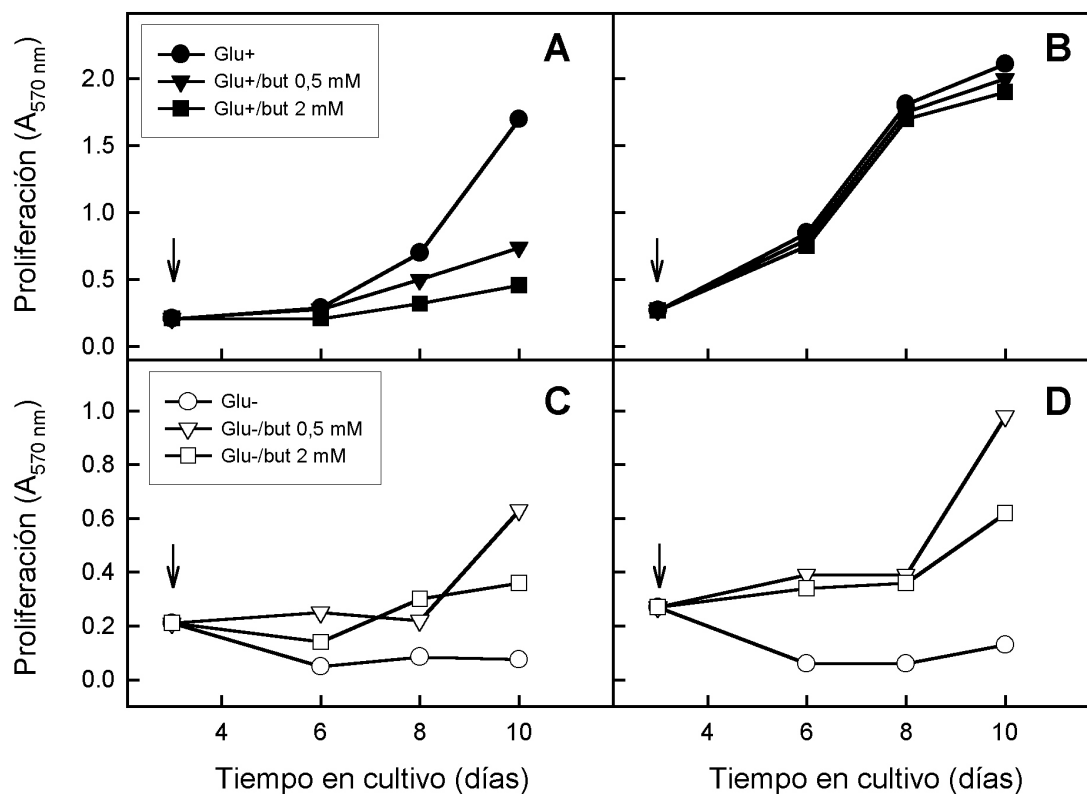


Figura 36.- Efecto de la glucosa y del butirato sobre la proliferación celular.

Se siembran 10^4 células BCS-TC2 (A y C) o BCS-TC2.BR2 (B y D) por pocillo de placas de 96 pocillos. A los 3 días, cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial, se cambia el medio de cultivo y se añade medio fresco en ausencia (Glu-) en presencia de glucosa (Glu+; 4,5 g/l) y/o butirato (0,5 o 2 mM) (la flecha indica este momento). A distinto tiempo se evalúa la proliferación celular mediante el ensayo del MTT, como se describe en Materiales y Métodos. Cada punto representa la media de los valores obtenidos en dos experimentos empleando 8 pocillos para cada punto. La desviación estándar es inferior al 1% en todos los casos.

Sin embargo, la adición de butirato a los cultivos en ausencia de glucosa evita que estos efectos sean tan drásticos. Así, las curvas obtenidas en ausencia de glucosa y en presencia de butirato sódico 0,5 o 2 mM ponen de manifiesto que el proceso de muerte celular y multiplicación se pueden compensar; llegándose incluso a apreciarse crecimiento (Figura 36 C y D) aunque en menor medida que en las células que se cultivan en presencia glucosa (Figura 36 A y B). Parece, por tanto, que la capacidad de ambas líneas celulares para proliferar en ausencia de glucosa puede ser debida a la utilización del butirato como fuente alternativa de energía. No obstante, esta capacidad no se incrementa con la concentración de butirato, sino que se aprecia mayor efecto a 0,5 mM que a 2 mM. Estudios llevados a cabo en células HT29 y S/RG/C2, muestran también que concentraciones bajas de butirato (0,5-2 mM) estimulan la proliferación de las células mientras que concentraciones mayores (4-6 mM) inhiben la proliferación (Singh y col., 1997).

Una posible explicación a esta acción contrapuesta del butirato en ausencia de glucosa podría fundamentarse en la capacidad con la que las células metabolizan el butirato. A bajas concentraciones, este agente se metabolizaría totalmente para obtener energía, lo que provocaría una reducción de la concentración de butirato intracelular y, por tanto, una reducción de sus propiedades antiproliferativas. Sin embargo, a altas concentraciones, no todo el butirato sería metabolizado y la concentración del agente en el interior de la célula se elevaría, provocando otros efectos sobre las células. Estos efectos podrían asemejarse a los descritos *in vivo*. Así, se ha sugerido que existe un gradiente de concentración de butirato a lo largo del eje colónico cripta-cara luminal, con una menor concentración en la base de las criptas (de menor accesibilidad al contenido del lumen), observándose el efecto estimulador del crecimiento en esta región. La mayor concentración de butirato en la cara que se expone directamente al lumen desencadena un efecto antiproliferativo y diferenciador (Csordas, 1996). A pesar de esta similitud con los efectos *in vivo*, las células tumorales presentan una mayor sensibilidad a los efectos del butirato. Esto podría estar causado por la propia naturaleza de las células tumorales, ya que, a diferencia de las correspondientes células normales, la captura y metabolización de la glucosa es mayor (Flier y col., 1987; Waki y col., 1998). De este modo, la respuesta de las células tumorales al butirato podría estar alterada debido a las diferencias en los requerimientos de glucosa, lo que provocaría una acumulación intracelular de butirato y explicaría la mayor sensibilidad a este agente.

Por otro lado, también hay que señalar que, aunque ambas líneas celulares son capaces de proliferar en ausencia de glucosa cuando hay butirato en el medio de cultivo, parece que las células BCS-TC2 tienen una mayor dificultad para crecer en estas condiciones, siendo el efecto más acusado para concentraciones de butirato sódico de 2 mM (Figura 36 C y D). Esto podría apuntar a la existencia de rutas de metabolización del butirato más activas en las células BCS-TC2.BR2. Esto no resulta del todo extraño ya que, a pesar de que las células BCS-TC2.BR2 se obtuvieron a partir de las células BCS-TC2, la selección se realizó creciendo de manera continua en presencia de butirato y, hasta el momento de la siembra para la realización de estos experimentos, no se eliminó el agente del medio de cultivo. El crecimiento continuado en presencia de este agente, por tanto, ha podido provocar la selección de una población en la que se han activado rutas antes “silenciosas” para paliar los efectos del butirato.

En cuanto al efecto del butirato sobre los cultivos que crecen en presencia de glucosa (Figura 36 A y B), se aprecia una inhibición del crecimiento en las células BCS-TC2 y una adaptación a estas condiciones de las células BCS-TC2.BR2. En la misma línea que los razonamientos anteriores, el efecto sobre las células BCS-TC2 podría estar causado por una acumulación intracelular del butirato provocada por una utilización preferente de la glucosa por parte de las células BCS-TC2. Dado que la concentración de glucosa extracelular es la misma para ambas líneas celulares (4,5 g/l), la mayor utilización de glucosa podría deberse a una mayor captura de glucosa por parte de las células BCS-TC2 y, por tanto, una mayor concentración de glucosa intracelular. Las diferencias en la captura de glucosa entre ambas líneas celulares podrían estar causadas por una distinta expresión de transportadores

encargados de capturar y transportar la glucosa al interior celular. Por este motivo, a continuación se ha estudiado la expresión de algunos miembros de la familia de transportadores de glucosa, también conocidos como GLUTs.

Transportadores de glucosa

Actualmente se conocen 9 miembros de esta familia (GLUT 1-9) que se diferencian entre sí por su afinidad por la molécula transportada, el tipo de azúcar transportado y su expresión tisular (apartado 1.6). El GLUT1 juega un papel importante en el transporte de glucosa a través de las barreras tisulares, en especial de la barrera hemato-encefálica, de ahí que se detecte una fuerte expresión en las células endoteliales que forman los capilares de esta barrera. En otros tejidos es difícil su detección, sin embargo, el GLUT1 se expresa en la mayoría de las células de distintos tipos de cáncer (Younes y col., 1996; Binder y col., 1997; Grover-McKay y col., 1998). Por las respuestas observadas a la eliminación de glucosa, y dada la implicación de este transportador en los procesos tumorales, se ha procedido a evaluar su expresión en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2. Al igual que en los experimentos de eliminación de glucosa, y dado que el butirato modifica la expresión génica de múltiples proteínas, se ha eliminado este agente del medio de cultivo de las células BCS-TC2.BR2 y, en estas condiciones, se han comparado los niveles constitutivos del GLUT1 en ambas líneas celulares. Ya que se ha descrito que un elevado porcentaje de este transportador está localizado en la membrana plasmática, se han utilizado para las valoraciones preparaciones de membranas celulares, calculándose que estas fracciones se enriquecen en unas 12 veces en el GLUT1 (McMahon y col., 2000). Los resultados obtenidos se recogen en la figura 37.

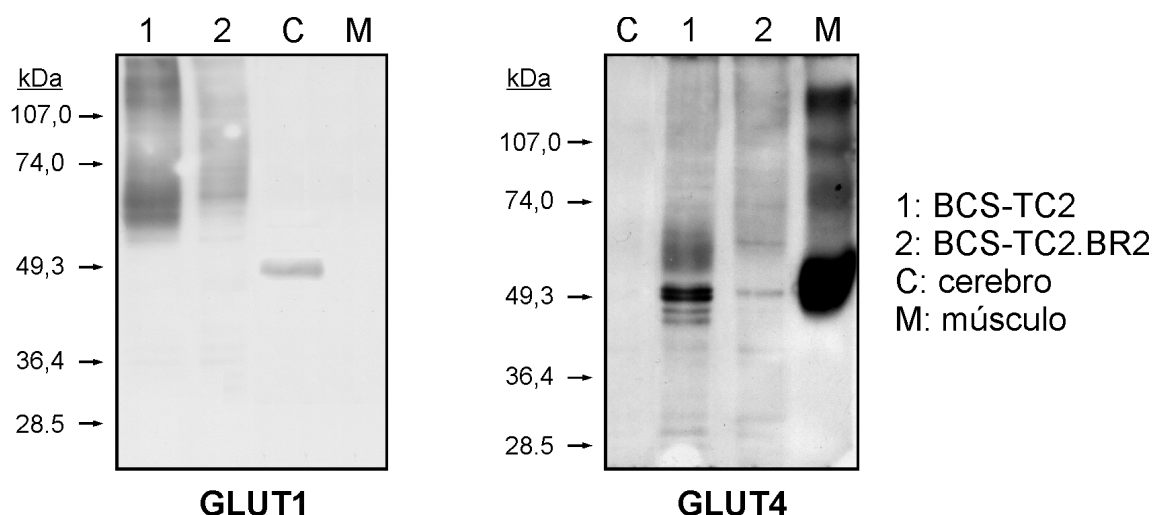


Figura 37.- Expresión constitutiva de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4.

Se siembran $7,5 \times 10^5$ células por cada placa de cultivo de 10 cm de diámetro, en medio DMEM completo. Cuando las células alcanzan la confluencia, se lavan con PBS y se procede a la obtención de membranas celulares según se describe en Materiales y Métodos. La separación de 40 µg de proteínas de extractos membranosos se realiza por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, tras lo cual se lleva a cabo la transferencia e inmunodetección. Como control positivo se utilizan preparaciones de membranas de cerebro y músculo de rata. El anticuerpo anti-GLUT 1 se emplea a una dilución 1/4.000, el anti-GLUT 4 a 1/1.000 y el anti-IgG de conejo a 1/3.000. El revelado se lleva a cabo empleando reactivos de ECL.

Tanto en las células BCS-TC2 como en las BCS-TC2.BR2 aparece una banda muy ancha en torno a 59 kDa y bandas de masa molecular superiores; este perfil electroforético se corresponde con las distintas formas glicosiladas del GLUT1. El densitometrado de las bandas muestra que los niveles de expresión del GLUT1 en las células BCS-TC2 son aproximadamente 5 veces superiores a los que presentan las células resistentes a butirato.

Otro de los transportadores de glucosa es el GLUT4, que fisiológicamente tiene una expresión muy limitada; se sintetiza en adipocitos y células musculares (que responden a insulina), y su expresión se relaciona con procesos de diferenciación (Viñals y col., 1997). Junto con el GLUT1, la expresión del GLUT4 también se ha descrito en algunos tumores de mama y en algunas líneas celulares tumorales (HL60, MDA-MB231, SK-BR3 y KB) (Binder y col., 1997). Por otro lado, en un estudio utilizando 70 tumores gástricos se ha observado que el GLUT4 es el transportador de glucosa más expresado; se expresa más que el GLUT1 (Noguchi y col., 1999). Aunque el GLUT4 no se ha detectado en epitelio normal de pulmón, sí se ha descrito su expresión en algunos carcinomas pulmonares, localizándose en las zonas de regeneración. Sin embargo, el GLUT1 se localiza preferentemente en zonas centrales y en áreas necróticas (Ito y col., 1998). Por ello también se ha evaluado su expresión en las líneas celulares objeto de estudio (Figura 37). La detección de una banda en torno a los 50 kDa en ambas líneas celulares sorprende ya que el GLUT4 no suele detectarse en tejido colónico tumoral (Grover-McKay y col., 1998; Noguchi y col., 2000). Por otro lado, como en el caso de GLUT1, la expresión del GLUT4 es mayor en las células BCS-TC2 (aproximadamente unas 5 veces).

Incrementos en la expresión de estos dos transportadores se pueden relacionar con un aumento en el transporte y en la utilización metabólica de la glucosa (Mueckler, 1994; Waki y col., 1998, Smith y col., 1999), que sería mayor en el caso de las células BCS-TC2. De este modo, el butirato no se metabolizaría tanto y provocaría los efectos antiproliferativos, diferenciadores e inductores de apoptosis ya comentados. Además, así se podría explicar los efectos observados en la curva de proliferación (Figura 36 A y B) teniendo en cuenta un efecto distinto del butirato en ambas líneas celulares cuando se cultivan en presencia de glucosa. No obstante, hay que considerar que existen otros tipos de transportadores de glucosa dependientes (SGLTs) o independientes (otros GLUTs) de energía que podrían también expresarse de modo diferencial en ambas líneas celulares y que podrían modificar la tasa metabólica de glucosa en cada una de ellas. También habría que tener en cuenta que, en otras líneas celulares, la incorporación metabólica de la glucosa no se correlaciona con los niveles del GLUT1 ni con el transporte del azúcar, sino que su metabolización más bien depende de la actividad mitocondrial (fosforilación oxidativa) de cada célula (Aloj y col., 1999).

También se ha estudiado el efecto del butirato y/o la eliminación de la glucosa en la expresión del GLUT1 tanto en las células BCS-TC2 como en las células BCS-TC2.BR2. En la figura 38 se muestran los resultados de la expresión de GLUT1 en las células BCS-TC2 cultivadas en medio con diversas concentraciones de glucosa y en presencia o en ausencia de

butirato. La eliminación de la glucosa del medio de cultivo provoca un incremento en la expresión del GLUT1, así como la aparición de una nueva banda proteica en torno a los 47 kDa. Esta inducción podría justificarse como una respuesta de la célula para intentar capturar más glucosa (incrementando el número de transportadores) cuando comienza a detectar que los niveles del azúcar disminuyen hasta desaparecer.

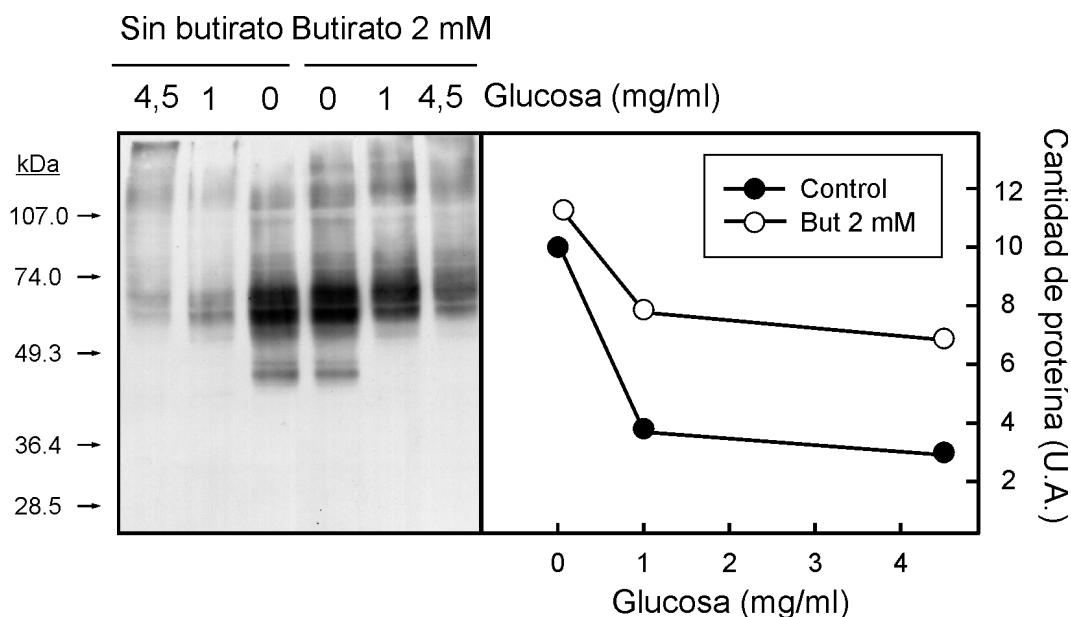


Figura 38.- Efecto de la glucosa y del butirato en los niveles de GLUT1 de las células BCS-TC2.

Se siembran $7,5 \times 10^5$ células por cada placa de cultivo de 10 cm de diámetro, en medio DMEM completo. Cuando las células se encuentran en fase confluyente, se retira el medio y se añade medio fresco en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de glucosa y/o butirato sódico 2 mM. A las 48 horas, se recogen los extractos celulares por raspado y se aíslan las membranas celulares como se indica en Materiales y Métodos. En la figura se muestran los niveles de GLUT1 analizados por *Western blot*. Se separan 20 µg de proteína de extractos de membrana mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, se transfieren a membranas de nitrocelulosa y se someten a inmunodetección. El anticuerpo anti-GLUT1 se emplea a una dilución 1/4.000 y el anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa a 1/3.000. El revelado se lleva a cabo por ECL. En la parte derecha de la figura se recoge la cuantificación tras densitometrado de los correspondientes geles.

El incremento en GLUT1 se ha descrito también para otras líneas celulares (Takano y col., 1988; Wertheimer y col., 1991) aunque la respuesta es dependiente del origen tisular, del tipo de línea celular y de los niveles constitutivos. Por ejemplo, en célula gliales, después de 24 horas en ausencia de glucosa el transportador se incrementa de 3 a 4 veces, pero no se afecta el de las células neuronales (Walker y col., 1988).

Esta inducción ha llevado a algunos autores a calificar al transportador GLUT1 como miembro de la familia de las GRPs (*Glucose-Regulated Protein*, pertenecientes a la familia de las HSPs pero que actúan en respuesta a glucosa en vez de a estrés térmico) que, aunque son estructuralmente distintos, responden de igual modo ante los mismos estímulos (Wertheimer y col., 1991). El incremento en la expresión de GLUT1 puede estar causado también por una disminución en el recambio normal de este transportador como sistema de

ahorro energético ante la ausencia de glucosa. Además, esta inducción puede ser reversible, retornando a los niveles basales de expresión cuando se repone la glucosa en el medio de cultivo (Walker y col., 1988).

En la figura 38 también se recoge el efecto del butirato en la expresión del GLUT1. La presencia de butirato 2 mM durante 48 horas, en los cultivos con glucosa, incrementa la expresión del GLUT1 en las células BCS-TC2, no observándose este incremento en ausencia de glucosa. Esta inducción no resulta extraña ya que, como se ha comentado, este agente modula la expresión de numerosas proteínas presumiblemente por activación transcripcional inducida por la hiperacetilación de las histonas (Pouillart y col., 1998). En estas condiciones la glucosa se metabolizaría con fines energéticos y el butirato se utilizaría con fines “reguladores”, alterando la expresión de proteínas. Otra posible explicación es que en estas condiciones el butirato induzca apoptosis, alterándose la actividad mitocondrial y provocándose la generación de radicales libres frente a lo que la célula tiene que responder. La incorporación de la glucosa desde la ruta glicolítica a la ruta de las pentosas podría hacer frente a la elevada concentración de radicales libres (Sun, 1990) pero ello conlleva un gasto extra de glucosa que se conseguiría incrementando su captura y, por lo tanto, la expresión del GLUT1.

El incremento inducido en la expresión del GLUT1 por butirato no es un hecho generalizado; este efecto es específico de especie y del tipo celular. Así en la línea celular LLC-PK₁ de hígado de cerdo se incrementa el mRNA del transportador tras sólo 24 horas en contacto con el butirato. Por el contrario, en células HepG2, de hepatoblastoma, células HT29, de carcinoma de colon, COS, de fibroblastos de mono, y RIN-m5F, los niveles de mRNA disminuyen considerablemente (Takano y col., 1988; Fernández-Mejía y Davidson, 1993; Tiedge y Lenzen, 1996). Además, esta disminución en los niveles del GLUT1 va acompañada de una reducción en el transporte de glucosa y se ha sugerido que todo ello puede estar causado por cambios en la glicosilación del transportador provocados por el butirato (Fernández-Mejía y Davidson, 1993).

La inducción del GLUT1 por butirato casi no se observa cuando las células se cultivan en ausencia de glucosa, condiciones en las cuales el nivel del transportador ya se ha incrementado. En la línea LLC-PK₁ de hígado de cerdo se describieron efectos similares en cuanto a la inducción del GLUT1 por butirato; sin embargo, la eliminación de la glucosa del medio de cultivo reducía considerablemente el efecto ejercido por el butirato en presencia de glucosa (Takano y col., 1988). Por ello, se sugirió que el efecto del butirato podía ser dependiente de la presencia de glucosa en el medio de cultivo. En este sentido, está ampliamente descrito que la glucosa y/o sus metabolitos juegan un importante papel en la regulación transcripcional de determinados genes o en la estabilidad del mRNA (Dang y col., 1997). En el caso de las células BCS-TC2 se puede, por tanto, pensar que al mantenerse en presencia de butirato, y éste utilizarse principalmente con fines energéticos para paliar la falta de glucosa, no se observaría una inducción adicional de proteínas respecto al incremento

observado tras la eliminación de glucosa.

Cuando se analizan estos efectos en las células BCS-TC2.BR2, la tendencia observada ante los diferentes estímulos es similar a la obtenida en las células BCS-TC2 (Figura 39). Sin embargo, la proporción que existe entre las formas de mayor masa molecular y la banda de 47 kDa, que aparece en los cultivos sin glucosa, es diferente en ambas líneas celulares. Mientras que en las células BCS-TC2 las formas mayoritarias del GLUT 1 están glicosiladas (relación de 6 a 8 veces), en las células BCS-TC2.BR2, la proporción entre las formas glicosiladas y la banda de 47 kDa (relación en torno a 1) es similar.

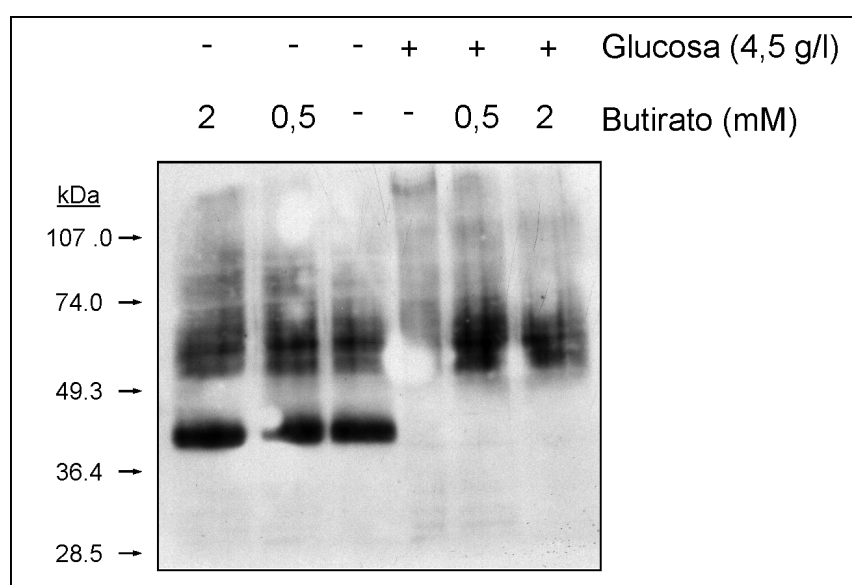


Figura 39.- Efecto de la glucosa y el butirato en la expresión de GLUT1 de las células BCS-TC2.BR2.

Se siembran $7,5 \times 10^5$ células por cada placa de cultivo de 75 cm^2 de superficie en medio DMEM completo. Cuando las células se encuentran en fase confluyente, se retira el medio y se añade medio fresco en ausencia o en presencia de glucosa (4,5 g/l) y/o distintas concentraciones de butirato sódico. A las 48 horas, se recogen los extractos celulares por raspado y se aíslan las membranas celulares como se indica en Materiales y Métodos. En la figura se muestran los niveles de expresión del GLUT1 analizados por *Western blot*. Se separan 20 μg de proteínas de extractos de membrana por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, se transfieren a membranas de nitrocelulosa y se someten a inmunodetección. El anticuerpo anti-GLUT1 se emplea a una dilución 1/4.000 y el anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa a 1/3.000. El revelado se lleva a cabo mediante ECL.

La banda de 47 kDa, más abundante en las células BSC-TC2.BR2, cabe pensar que sea la forma desglicosilada del GLUT1 ya que aparece sólo cuando las células se cultivan en ausencia de glucosa. En estos cultivos, la glucosa remanente en el interior de la célula glicosilaría los nuevos transportadores que se están biosintetizando (inducidos por la eliminación de glucosa) y daría cuenta del incremento observado en las formas glicosiladas. Sin embargo, llegaría un momento en que la glucosa podría llegar a desaparecer o se utilizaría para otras rutas más vitales. Así, la célula no sería capaz de glicosilar los GLUT1 recién biosintetizados, lo que justificaría la aparición de una banda de 47 kDa correspondiente al

GLUT1 no glicosilado. Aunque se ha descrito que muchas glicoproteínas que sufren una glicosilación aberrante permanecen en el retículo endoplásmico interaccionando con caperonas, en el caso del GLUT 1 parece que la forma no glicosilada puede llegar a la membrana plasmática, como se ha puesto de manifiesto en las células 3T3-L1 en ausencia de glucosa (McMahon y col., 2000).

Para comprobar si la banda de 47 kDa corresponde a la forma no glicosilada, extractos de membrana se trataron con Endoglicosidasa F/N-glicosidasa F, actividades enzimáticas capaces de desglicosilar a numerosas glicoproteínas. El resultado obtenido se recoge en la figura 40. Como se puede apreciar, en los cultivos con glucosa se detecta un conjunto de bandas en torno a los 60 kDa y superiores, que desaparece cuando el extracto se incuba con las glicosidasas, apareciendo una banda mayoritaria de 47 kDa. Lo mismo ocurre en los extractos procedentes de cultivos que se han mantenido en ausencia de glucosa. El tratamiento enzimático provoca la desaparición de las bandas de mayor masa molecular e incrementa la ya existente, indicando que se trata de la forma desglicosilada de GLUT1.

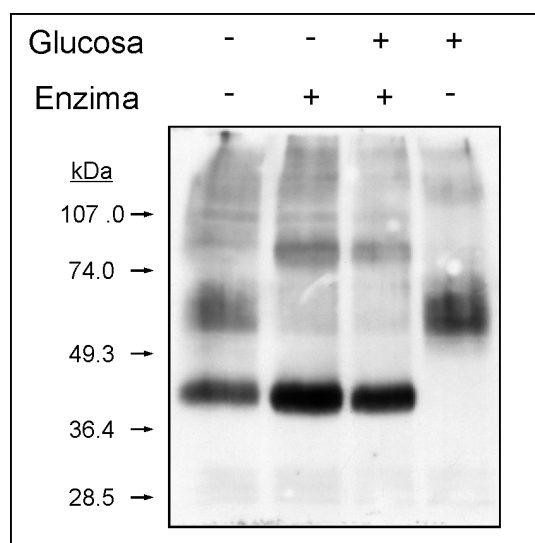


Figura 40.- Desglicosilación de GLUT 1 por endoglicosidasa F/N-glicosidasa F.

Los extractos de membrana en presencia o en ausencia de glucosa se obtienen como se indica en la figura 39. Se incuban 40 µg de proteínas de membranas celulares 18 horas a 37°C con 0,2 U de endoglicosidasa F/N-glicosidasa F, en el tampón adecuado, como se indica en Materiales y Métodos. El resultado de la incubación se analiza por *Western blot*. El anticuerpo anti-GLUT1 se emplea a una dilución 1/4.000 y el anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa a 1/1.000. El revelado se lleva a cabo por ECL.

La presencia de bandas más tenues de alta masa molecular en los extractos tratados con la enzima, y sin descartar que se traten de formas poliméricas, podrían indicar la existencia de regiones resistentes a esta digestión. En este sentido, se ha descrito, en híbridos de células Hela y fibroblastos, que el GLUT1 contiene cadenas ramificadas de tipo tri- o tetra-antena de oligosacáridos con repeticiones de N-acetil-lactosamina, que resultan resistentes a la digestión

por la enzima endoglicosidasa F (Kitagawa y col., 1995). También, el hecho de que cuantitativamente la banda correspondiente al GLUT1 desglucosilado sea más intensa en los extractos sin glucosa que en presencia del azúcar una vez digeridos con la enzima, confirma la inducción del GLUT1 en situaciones restrictivas de glucosa.

Las estructuras oligosacáridas de numerosas proteínas pueden jugar un importante papel en la secreción de proteínas, en el reconocimiento célula-célula y en el tráfico de proteínas en orgánulos celulares. Numerosos estudios han asignado funciones diversas para la N-glicosilación de los GLUTs. Los resultados de Asano y colaboradores (1991) sugieren que, aunque la N-glicosilación de los transportadores no es indispensable para la actividad transportadora de los GLUTs, parece que juega un importante papel en el mantenimiento de una estructura con gran afinidad por glucosa, que provoca un incremento en su actividad transportadora. En células leucémicas, los cambios en la N-glicosilación no afectan a la distribución del GLUT1 y el transportador se localiza en la membrana plasmática, pero se ha sugerido que la presencia del GLUT1 glicosilado en la superficie celular podría jugar un papel importante en el crecimiento y mantenimiento del fenotipo leucémico, incrementando la presencia de glucosa como nutriente en el microambiente local (Ahmed y Berridge, 1999). Es más, en híbridos de células Hela y fibroblastos, los cambios en la glicosilación de la proteína GLUT1 están asociados con un gen supresor tumoral mutado y así, la afinidad por la 2-desoxiglucosa del híbrido tumorigénico, que expresa el GLUT1 más glicosilado, es dos veces mayor que en el híbrido no tumorigénico (Kitagawa y col., 1995).

En las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 no se pueden establecer correlaciones entre la glicosilación y la tumorigenicidad, ya que los niveles de expresión de GLUT1 no son comparables entre ambas líneas celulares. Sin embargo, para poder relacionar las diferencias observadas en la expresión de este transportador entre ambas líneas celulares, se ha evaluado la expresión del GLUT1 en otras sublíneas tumorigénicas derivadas de las células BCS-TC2.

En la figura 41 puede apreciarse que la expresión del GLUT1 en las células BCS-TC2 no tumorigénicas es superior a la del resto de las líneas tumorigénicas analizadas. Este resultado parece indicar una relación inversa entre la expresión de GLUT1 y la malignidad de las células. Sin embargo, estos datos no concuerdan con lo documentado para otros sistemas celulares. Por ejemplo, el análisis de distintos cortes tisulares de la secuencia colónica adenoma-carcinoma muestra que GLUT1 se expresa en las etapas tardías de la transformación maligna, considerándose como un marcador de progresión tumoral y de mal pronóstico (Younes y col., 1996; Haber y col., 1998). Lo mismo ocurre para otros tejidos tumorales (Binder y col., 1997; Younes y col., 1997; Grover-McKay y col., 1998). En esta línea, la expresión del GLUT1 en tumores más agresivos se relaciona con una ventaja selectiva de las células más malignas *in vivo*, ya que, tienen una actividad metabólica más alta y normalmente se encuentran en regiones donde el acceso a la glucosa está reducido. Así, se ha descrito un incremento de este transportador en áreas centrales y necróticas del tumor (Ito y col., 1998), donde la accesibilidad de nutrientes es menor. Las células BCS-TC2, a pesar de presentar una

expresión mayor del GLUT1 que las líneas tumorigénicas, lo que facilitaría en principio su capacidad maligna, debe requerir otros factores (secreción de MMPs, factores angiogénicos, etc.) para poder exhibir potencial tumorigénico.

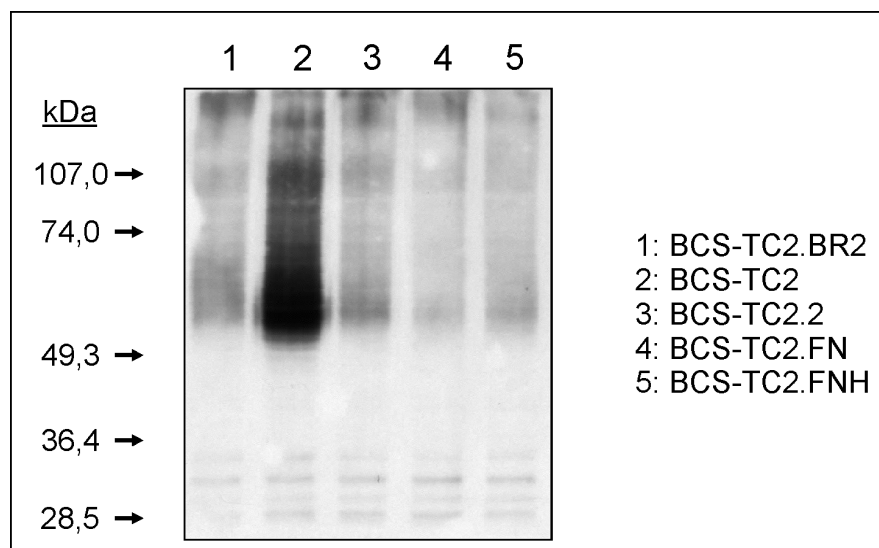


Figura 41.-Expresión del GLUT1 en distintas líneas celulares.

Se siembran $7,5 \times 10^5$ células por cada placa de cultivo de 10 cm de diámetro en medio DMEM completo. Cuando las células se encuentran en fase confluyente, se retira el medio y se procede en idénticas condiciones a las descritas en la figura 37. En la figura se muestra la expresión de GLUT1 analizada por *Western blot*. El anticuerpo anti-GLUT1 se emplea a una dilución 1/4.000 y el anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa a 1/3.000. El revelado se lleva a cabo mediante ECL.

En un reciente estudio histológico en adenomas colorrectales, aunque se describe la elevada expresión del GLUT1 en tumores mas agresivos, parece que la expresión depende también del estado de diferenciación celular (mayor grado de diferenciación menos expresión de GLUT1) (Sakashita, 2001). También en una línea eritroblástica de pollo, que expresa GLUT1 y GLUT3, se ha observado una reducción de la expresión después de inducir la diferenciación (Grdisa y White, 2000). Por ello, podría pensarse que el mayor grado de diferenciación en las líneas analizadas podría dar cuenta de la reducción en la expresión de GLUT1. Sin embargo, las células BCS-TC2.2 son tumorigénicas pero menos diferenciadas que las parentales.

4.5.2 Resistencia al estrés térmico

Una respuesta común de todas las células a temperaturas anormalmente altas o a insultos metabólicos o ambientales es la estimulación de la expresión del grupo de proteínas de choque térmico (HSPs) (apartado 1.5). Niveles elevados de expresión constitutiva de las HSPs podrían contribuir a que las células muestren una mayor supervivencia en condiciones ambientales adversas. Por otro lado, durante la carcinogénesis se han observado alteraciones

en los niveles de expresión de distintas HSPs, sin embargo, los datos son escasos y en muchos casos contradictorios (Sarto y col., 2000). Por ello, se procedió a analizar los niveles de proteína constitutivos de distintas HSPs en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2. Además, también se ha analizado la expresión de estas proteínas en las células BCS-TC2.2, cuyas características están recogidas en la tabla VIII, para determinar si existe alguna correlación con la capacidad tumorigénica en este sistema. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 42.

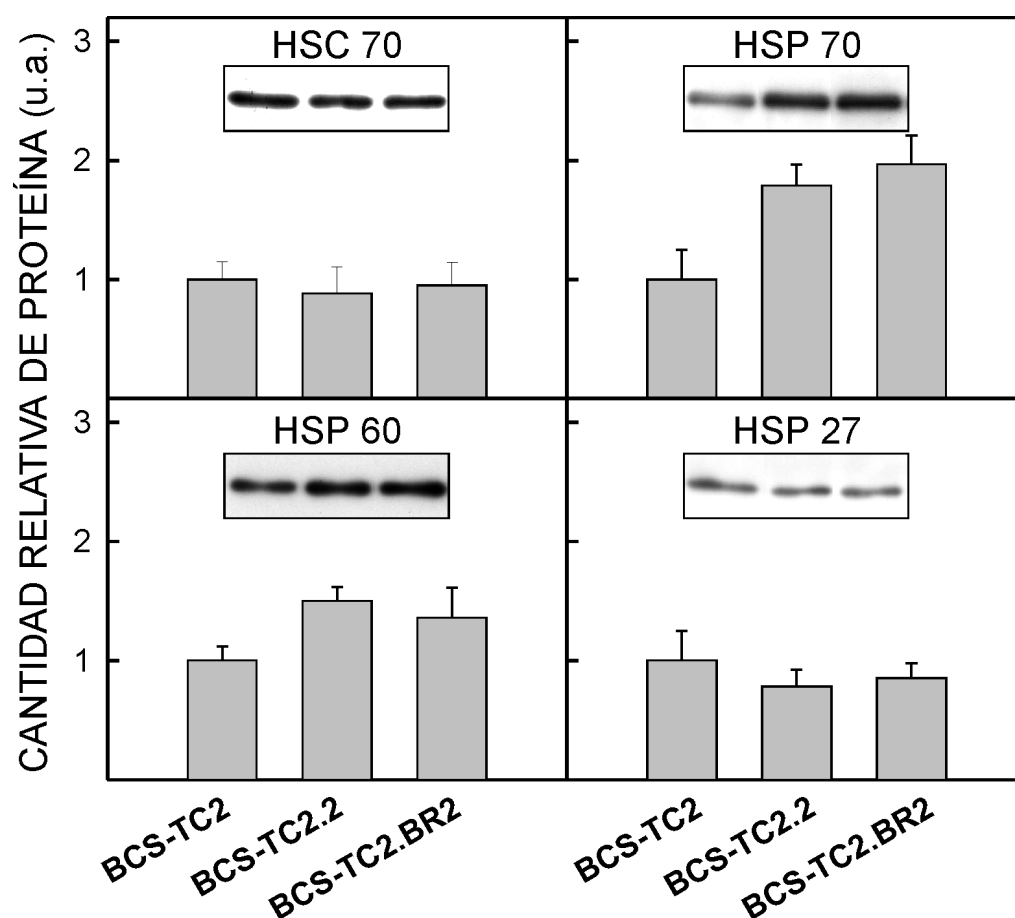


Figura 42. Expresión basal de las HSPs en las diferentes líneas celulares.

Se analizan mediante electroforesis de geles de poliacrilamida (10%) en presencia de SDS y condiciones reductoras, 7 μ g de proteína total de las células BCS-TC2, BCS-TC2.2 y BCS-TC2.BR2 cultivadas en condiciones estándar. Las proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa y se someten a inmunodetección como se indica en Materiales y métodos. Los correspondientes anticuerpos anti-HSPs se emplean a una dilución 1:5.000; el anti-IgG de ratón y el anti-IgG de rata marcados con peroxidasa se emplean a una dilución de 1:5.000 y 1:20.000 respectivamente. El revelado se lleva a cabo por ECL como se describe en Materiales y métodos. En la figura se muestra el densitometrado del resultado obtenido y mostrado en el inserto. Los resultados están expresados como el volumen de banda densitometrada correspondiente a cada HSP normalizada respecto al correspondiente volumen de la proteína control, al que se ha asignado el valor de 1. Se muestran los resultados (media \pm SD) de tres experimentos independientes.

Como se puede observar en la figura 42, los niveles de la HSC 70 son prácticamente iguales en todas las líneas celulares. Este resultado está de acuerdo con los datos que establecen que en la mayor parte de las líneas celulares de mamífero, la HSC 70 se expresa constitutivamente y sus niveles están controlados principalmente por factores que afectan a la proliferación celular (Lindquist y Craig, 1988; Sacchi y Schiaffonati, 1996; Mangurten y col., 1997). En este caso, la expresión de la HSC 70 es bastante alta en condiciones controles o basales, al igual que se ha descrito para otras células en fase proliferativa (Schiaffonati y col., 1991). Además, puesto que todas las células se han recogido en idénticas condiciones de crecimiento, esto justificaría que no se aprecien diferencias significativas en los niveles de la HSC 70 entre ellas. Asimismo, distintos estudios han sugerido un posible papel de la HSC 70 en la transformación celular debido a su capacidad para unirse a ciertas proteínas oncogénicas (Stürzbecher y col., 1988) o porque su sobreexpresión suprime la transformación de fibroblastos embrionarios de ratón (Yehiely y Oren, 1992). Sin embargo, en este caso, con los resultados obtenidos no es posible establecer una correlación entre la expresión de esta proteína y la adquisición de un fenotipo tumorigénico y/o maligno en estas células.

A diferencia de lo que ocurre con la HSC 70 se aprecian variaciones significativas en los niveles de proteína de HSP 70 (Figura 42). Un primer aspecto a mencionar es su expresión en condiciones normales de crecimiento en ausencia aparente de cualquier tipo de estrés; está ampliamente aceptado que la HSP 70 se expresa mínimamente en condiciones basales. Sin embargo, se ha descrito que las líneas celulares de primates expresan niveles significativos de la HSP 70 bajo condiciones fisiológicas normales (Milarski y Morimoto, 1986; Mangurten y col., 1997). Teniendo en cuenta que las líneas celulares humanas suelen derivar de tumores o se immortalizan por infección viral o transformación, se ha sugerido que la expresión constitutiva de HSP 70 podría reflejar meramente un estado patológico. Además, puesto que las células en cultivo se mantienen en un entorno radicalmente distinto, el patrón de expresión de proteínas podría no corresponder al de los tejidos normales o intactos. Sin embargo, distintos estudios apuntan a que existe un cierto grado de expresión constitutiva de HSP 70 en determinados tejidos humanos (Mangurten y col., 1997) o de otras especies (Beck y col., 1995 a y b). También, se ha descrito la presencia de HSP 70 en colon normal de rata (Beck y col., 1995a), sugiriéndose que esta expresión es debida a características intrínsecas de las células más que a condiciones fisiológicas o ambientales (por ejemplo, presencia de bacterias causantes de estrés, etc.) (Beck y col., 1995a y b).

El nivel de la proteína HSP 70 observado en las células BCS-TC2.BR2 es casi el doble que el de las células parentales. Numerosos estudios revelan que los niveles de algunas HSPs se incrementan con la diferenciación celular (Mivechi y col., 1994; García-Bermejo y col., 1995). Sin embargo, otros resultados indican que, aunque la HSP 70 se induce por butirato, no es requerida estrictamente durante el proceso de diferenciación (García-Bermejo y col., 1997). En este caso, los niveles de la HSP 70 de las células BCS-TC2.2 son más elevados que en las células parentales y sin embargo, su grado de diferenciación es menor (López-Conejo y col., 1997). Por tanto, no parece existir una correlación entre los niveles de esta proteína y

el grado de diferenciación de las células. Sin embargo, sí parece darse una correlación entre la expresión de la proteína y la capacidad tumorigénica de las células. Estos resultados coincidirían con los que sugieren que la expresión de la HSP 70 es mayor en tumores malignos que en lesiones benignas del mismo origen (Athanasiadou y col., 1998; Kaur y col., 1998). En concreto, en carcinomas colorrectal y de mama, la expresión de la HSP 70 se ha correlacionado con bajo grado de diferenciación y peor pronóstico (Takahashi y col., 1994; Lazaris y col., 1995; Lazaris y col., 1997), aunque en carcinoma renal y en células escamosas de esófago se ha asociado con un buen pronóstico (Santarosa y col., 1997; Kawanishi y col., 1999).

En cuanto a la expresión constitutiva de la HSP 60 también se aprecian diferencias entre las tres líneas celulares siendo menor en las células BCS-TC2. La HSP 60 se expresa constitutivamente en la mayor parte de las células normales y se ha detectado en la mayoría, si no en todas las células neoplásicas (Hsu y Hsu, 1998). Sin embargo, a diferencia de otras HSPs, existen menos estudios que evalúen las interrelaciones entre los niveles de esta proteína y los procesos tumorales. En este contexto, recientemente se ha descrito un incremento en la expresión de la HSP 60 en pólipos de colon respecto del tejido colónico normal (Melis y White, 1999). Estos resultados estarían en concordancia con lo observado en las células de adenocarcinoma de colon objeto de este estudio, donde se observa un incremento en los niveles de la HSP 60 en las células con capacidad tumorigénica respecto a las no tumorigénicas.

A diferencia de la HSP 60, los estudios relativos a cambios en los niveles de expresión de HSP 27 en procesos tumorales son bastante abundantes. La mayoría de las líneas celulares normales sintetizan poco la proteína HSP 27, siendo por tanto casi indetectable en condiciones basales (Arrigo y Landry, 1994). Sin embargo, en las células transformadas analizadas se observa una expresión clara de esta proteína. En tumores humanos se ha encontrado que el nivel de expresión de la HSP 27 es muy variable. Así, su expresión es baja en células humanas de mama normales, variable en lesiones benignas y alta en tumores malignos (Thor y col., 1991; Morino y col., 1997). Por ello, aunque hay datos conflictivos, los cambios en los niveles de expresión de HSP 27 se han propuesto como un factor pronóstico importante en el cáncer de mama (Thor y col., 1991), así como en otros tipos de tumores (Morino y col., 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos para estas células de adenocarcinoma de colon, apuntan hacia una no modificación o un ligero descenso de la HSP 27 con la adquisición del fenotipo tumorigénico.

Estudios de hipertermia

En las células tumorales, la síntesis anormal de las HSPs puede ser atribuida, al menos en parte, a los cambios en la tolerancia al calor (condiciones febriles) que acompañan a la transformación maligna (Bardella y col., 1986; Sutherland y col., 1986; Tomasovic y Welch, 1986). De hecho, en algunos casos se han descrito respuestas al choque térmico alteradas en ciertas células tumorales. Por ejemplo, se ha observado una inducción deficiente de la HSP

70 en líneas celulares de linfoma de células B y en células de retinoblastoma (Mathur y col., 1994; Davidson y col., 1995; Zhang y col., 1998). Asimismo, alteraciones en los niveles de expresión de ciertas HSPs (fundamentalmente, HSP 70 y HSP 27) se correlacionan con un aumento en la resistencia a apoptosis inducida por una gran variedad de agentes citotóxicos (Jäättelä, 1999). Esto estaría relacionado con la resistencia de ciertos tumores a quimioterapia (Bruey y col., 2000; Creagh y col., 2000b). Teniendo en cuenta estos hechos, se ha planteado determinar si las células detectan el tratamiento térmico como un estímulo capaz de desencadenar la respuesta al estrés mediante la inducción de distintas HSPs y si éstas son las responsables del diferente comportamiento de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 ante la inducción de apoptosis.

La hipertermia induce muerte celular en una gran variedad de células tumorales. Sin embargo, la supervivencia celular tras la hipertermia depende de la temperatura aplicada y de la duración de la exposición (Li y Nussenzweig, 1996). En general, y aunque en las células de mamífero comienzan a observarse alteraciones en su patrón de transcripción a partir de 39°C, normalmente se requieren temperaturas superiores a los 40°C para que se aprecie claramente un incremento en la expresión de las HSPs.

Los resultados de los niveles de proteína de distintas HSPs tras someter a las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 a 42°C durante distintos periodos de tiempo se muestran en la figura 43. En todos los casos, durante el tiempo de duración del ensayo, los niveles de las respectivas HSPs en las células control, mantenidas siempre a 37°C, no experimentan variaciones significativas. Como se puede apreciar en la figura 43, los niveles de la proteína HSC 70 no varían significativamente con respecto a sus controles en las primeras 8 horas de tratamiento; sólo a tiempos superiores, es posible apreciar un ligero descenso en la expresión de esta proteína. Esta respuesta es cualitativamente similar en los dos tipos de células analizados.

Por el contrario, en los niveles de la HSP 70 (Figuras 43) se detecta un aumento significativo de esta proteína tras el estímulo térmico; corroborando las diferencias descritas entre estos dos miembros de la familia de las HSP 70 (Feige y Polla, 1994). La HSC 70, de 73 kDa, desempeña un papel celular importante en condiciones normales y no es inducida en situaciones de estrés, mientras que la HSP 70, de 72 kDa, es inducida en condiciones de estrés, bajo las cuales se sabe que previene la agregación proteica, colabora en el correcto plegamiento de las proteínas y participa en la protección de otras enzimas frente a una posible inactivación (Skowyra y col., 1990; Li y Nussenzweig, 1996). En ambas líneas celulares, la inducción de la HSP 70 no es lineal con el tiempo de tratamiento. Así, en las células BCS-TC2 aparece un máximo en torno a las 4-6 horas de tratamiento en el que los niveles de proteína se han incrementado aproximadamente 3 veces, tras lo cual se aprecia un paulatino descenso en los niveles de la HSP 70. Este descenso no se pone de manifiesto en las células BCS-TC2.BR2.

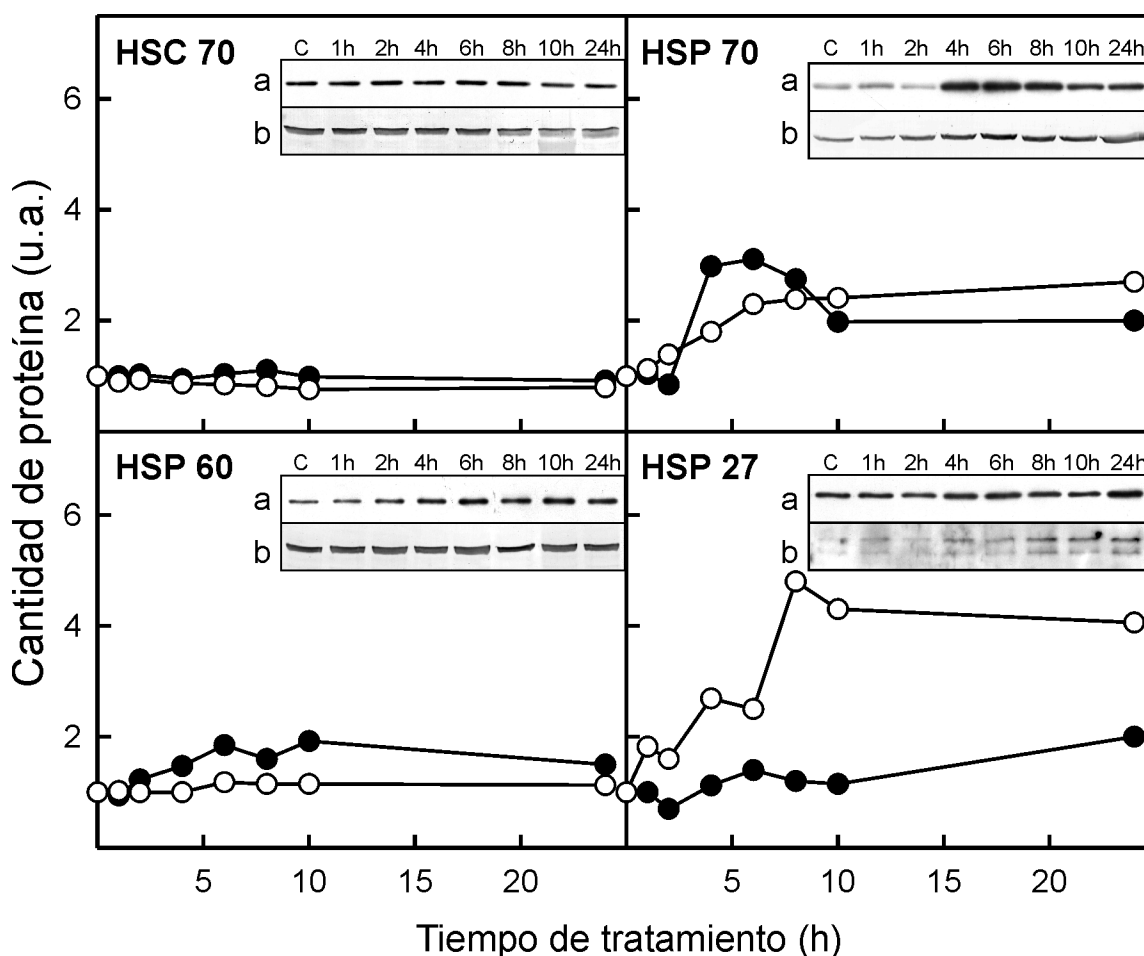


Figura 43.- Efecto de la hipertermia en la expresión de HSPs.

Los niveles de proteína de las diferentes HSPs se analizan mediante *Western blot* en ausencia (C) o después de distinto tiempo de tratamiento térmico a 42°C. Se analiza igual cantidad de proteína total de las distintas líneas celulares mediante electroforesis de geles de poliacrilamida (10%) en presencia de SDS y condiciones reductoras. Las proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa, realizándose la inmunodetección como se indica en Materiales y Métodos. Los correspondientes anticuerpos anti-HSPs se emplean a una dilución 1:5.000; el anti-IgG de ratón y el anti-IgG de rata marcados con peroxidasa se emplean a una dilución de 1:5.000 y 1:20.000 respectivamente. El revelado se lleva a cabo por ECL como se describe en Materiales y Métodos. En la figura se muestra el densitometrado correspondiente al resultado obtenido, mostrado en el inserto, para las células BCS-TC2 (a; punto negro) y BCS-TC2.BR2 (b; punto blanco). La cantidad de proteína está obtenida a partir del volumen de banda densitometrada correspondiente a cada HSP normalizada respecto al correspondiente volumen de la proteína control. Se asigna en todos los casos como 1 al valor obtenido en las células no sometidas a tratamiento térmico. El error de los tres experimentos independientes realizados es menor del 7%.

La principal función de las HSPs en un ambiente de estrés es proporcionar protección a la célula, y este poder de protección depende tanto del tiempo de exposición como de la severidad del estrés. Cuando el agente estresante es eliminado, los niveles de las HSPs disminuyen hasta sus niveles basales y, de este modo, las células pueden desarrollar sus funciones normales. Sin embargo, si el grado de estrés se incrementa, la presencia de las HSPs puede no ser capaz de proteger a la célula y entonces la célula muere. Así, la disminución en

el nivel de la HSP 70 en las células BCS-TC2 con el tiempo de exposición se podría correlacionar, no con la recuperación de los niveles basales de la HSP 70 en si, sino con la inducción de muerte celular al no ser capaces estas células de resistir un estímulo continuado de hipertermia a 42°C. La no disminución en los niveles de la HSP 70 en las células BCS-TC2.BR2 podría estar relacionada con su capacidad tumorigénica y podría dar cuenta de una mayor termotolerancia y, por tanto, una mayor resistencia a la muerte celular de estas células por hipertermia a 42°C. Esto implicaría que se requiere un mayor daño para inducir la respuesta. En este sentido, como se observa en la figura 43, el incremento en los niveles de la HSP 70 es inferior y necesita tiempos más largos de hipertemia para ponerse de manifiesto. Por otro lado, esta mayor termotolerancia podría ser consecuencia de la ligera mayor expresión basal de esta proteína en las células BCS-TC2.BR2. En este sentido se ha descrito que la sobreexpresión de uno o más genes *hsp* es suficiente para proteger las células contra otras exposiciones letales al calor, a drogas citotóxicas, toxinas, etc. (Parsell y Lindquist, 1994).

En lo que respecta a los niveles de la HSP 60 (Figura 43), mientras que se observa un incremento en las células BCS-TC2, tanto mayor a más tiempo de tratamiento, en las células BCS-TC2.BR2 prácticamente no se detecta modificación. Lo observado para las células BCS-TC2.BR2 coincide con lo descrito en otros sistemas en los que esta HSP apenas se modifica con el choque térmico (McMillan y col., 1998), aunque por su restringida localización podría ser un buen marcador del daño que distintos agentes pueden ejercer de forma directa o indirecta sobre la mitocondria. Teniendo en cuenta esto, la variación de la HSP 60 en las células BCS-TC2 podría ser reflejo de muerte o deterioro celular, lo cual estaría en concordancia con la disminución en los niveles de la HSP 70 a tiempos largo de tratamiento.

Como se observa en la figura 43, aunque se detecta un incremento en los niveles de la HSP 27 para ambas líneas celulares, éste es considerablemente superior en las células BCS-TC2.BR2. Además, se produce a tiempos de tratamiento superiores a los requeridos para inducir el máximo de expresión para la HSP 70, lo que concuerda con lo descrito de que la cinética de expresión de la HSP 27 va algo mas retardada que la de la HSP 70. Otro hecho a destacar es que, en determinados casos, en los primeros momentos del estímulo se aprecia un leve descenso en los niveles de la HSP 27. Esto ya se había observado previamente habiéndose sugerido que puede ser debido a la reducción en la transcripción y en la traducción de mRNAs que tiene lugar en la fase de alteración que acompaña al inicio del estrés (Burel y col., 1992). Las HSPs de masa molecular pequeña confieren resistencia celular al estrés térmico y participan en el fenómeno de termotolerancia, acelerando la recuperación de la transcripción y síntesis de proteína, de la agregación proteica nuclear y previniendo la disrupción del entramado de microfilamentos celulares. El mayor incremento observado en las células BCS-TC2.BR2 podría dar cuenta de una mayor termotolerancia de estas células.

Por otro lado, también se observa que el anticuerpo específico frente a la HSP 27 reconoce dos proteínas en las células BCS-TC2.BR2 (Figura 43). Estudios previos han mostrado en distintos tipos de células que la HSP 27 se fosforila después de distintos tipos de

tratamientos estresantes (Oesterreich, 1990; Landry y col., 1991). Se ha sugerido que el grado de fosforilación de la HSP 27 parece determinar la capacidad de las células para sobrevivir a la hipertermia (Landry y col., 1991). Además, la HSP 27 presente en las células tumorales y la de células no transformadas difieren en sus patrones de fosforilación lo que se ha correlacionado con la resistencia o susceptibilidad a fármacos quimioterapéuticos (Têtu y col., 1992; Ciocca y col., 1993). Así, la aparición de posibles isoformas de la HSP 27 en las células BCS-TC2.BR2 y su ausencia en las parentales, BCS-TC2, podría estar relacionado con diferencias en la resistencia a la apoptosis.

Para verificar si las células BCS-TC2.BR2 presentan una mayor tolerancia térmica se procedió a analizar la viabilidad celular. Para ello se evalúa la actividad mitocondrial, reflejo del número de células viables, inmediatamente después de someter las células a distintos tiempos de tratamiento térmico a 42°C. Los resultados obtenidos en este estudio se recogen en la figura 44. Como se puede apreciar, la viabilidad celular o la capacidad de proliferación disminuye a medida que es mayor el tiempo de hipertermia. Además, a tiempos cortos no se detectan diferencias significativas entre las dos líneas celulares. Sin embargo, éstas diferencias se acusan a las 24 horas de tratamiento, cuando la viabilidad es considerablemente inferior en las células BCS-TC2 (50%) que en las células BCS-TC2.BR2 (70%).

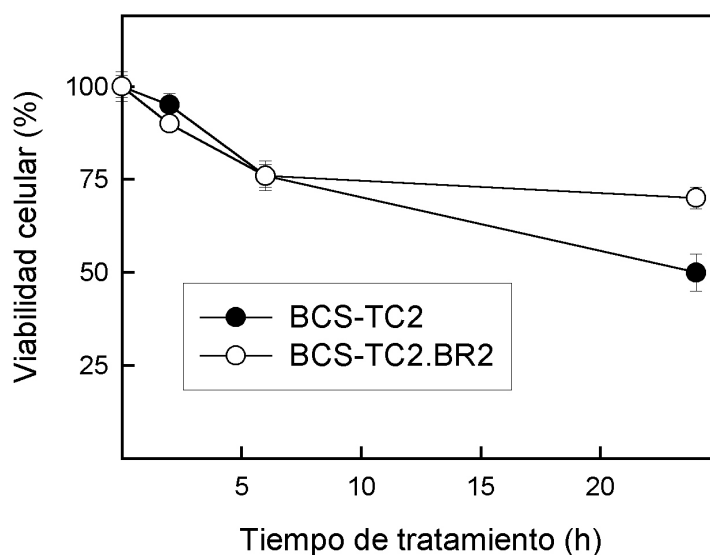


Figura 44.- Efecto de la hipertermia sobre la viabilidad celular.

Las células se incuban a 42°C durante distinto tiempo. Inmediatamente después se evalúa la viabilidad celular de los cultivos cuantificando la actividad mitocondrial mediante el ensayo de MTT como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, considerando como el 100% la actividad mitocondrial (A_{570nm}) de las células control incubadas a 37°C.

Estudios de choque térmico

Distintos estudios han revelado que, en dependencia del grado de estrés térmico producido, se puede inducir muerte celular por apoptosis o por necrosis (Goto y col., 1999; Li y col., 1999). Además se ha sugerido que mientras la exposición a condiciones de estrés extremo son dañinas y pueden resultar en muerte celular, la exposición transitoria a temperaturas elevadas (choque térmico) u otras formas de estrés tienen un efecto protector contra la exposición letal de diferentes formas de estrés, lo que puede ser importante como estrategia terapéutica o de supervivencia celular (Morimoto y Santoro, 1998). Así, se ha planteado analizar la respuesta de ambos tipos de células después de una exposición transitoria a temperatura elevada en dos condiciones térmicas distintas. Se han elegido como condiciones moderadas un único estímulo de 2 horas a 42 °C y distintos tiempos de recuperación posterior a 37°C. Este tiempo de tratamiento se ha seleccionado porque en los estudios de hipertermia no se observaba modificación significativa en los niveles de las HSPs (Figura 43) y la viabilidad celular se mantiene por encima del 90% en todos los casos (Figura 44). Por otro lado, como condiciones extremas de tratamiento se somete a las células a 45°C durante 2 horas. Estas condiciones, se han seleccionado porque en otros sistemas celulares inducen un elevado porcentaje de muerte celular, incluso por necrosis, a diferencia de lo que ocurre en las condiciones moderadas, donde la muerte celular se induce fundamentalmente por apoptosis (Chien y Branemark, 1999).

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 45. Como se puede apreciar, y de acuerdo con los resultados previos, no se detectan variaciones significativas en los niveles de HSC 70 en ninguna de las líneas celulares e independientemente de las condiciones de tratamiento térmico (Figura 45). Sin embargo, al analizar los resultados obtenidos relativos a la variación de los niveles de la HSP 70, se pone de manifiesto que las células han detectado el aumento transitorio de temperatura como una forma de estrés que desencadena la respuesta al choque térmico con el consiguiente incremento en los niveles de la HSP 70. Los resultados, si bien son cualitativamente similares, en las condiciones severas el incremento producido es cuantitativamente superior.

Como se puede observar, en las células BCS-TC2 sometidas a estímulo muestran un incremento paulatino de sus niveles de la HSP 70, apareciendo un máximo aproximadamente dos horas después de haber concluido el estímulo. Así, se produce un incremento de aproximadamente 3 veces en las condiciones moderadas y de 6 veces en las condiciones severas y, posteriormente, una disminución en los niveles de proteína. Si bien en los estudios de hipertermia, se detecta también una disminución en los niveles, ésta se puede asociar a muerte celular al mantenerse la fuente de estrés. En este caso, dado que está totalmente aceptado que el tratamiento de las células a una temperatura subletal conduce a la expresión inducida de ciertas HSPs de carácter transitorio (Morimoto y col., 1997), debería relacionarse con una tendencia a recuperar los niveles basales.

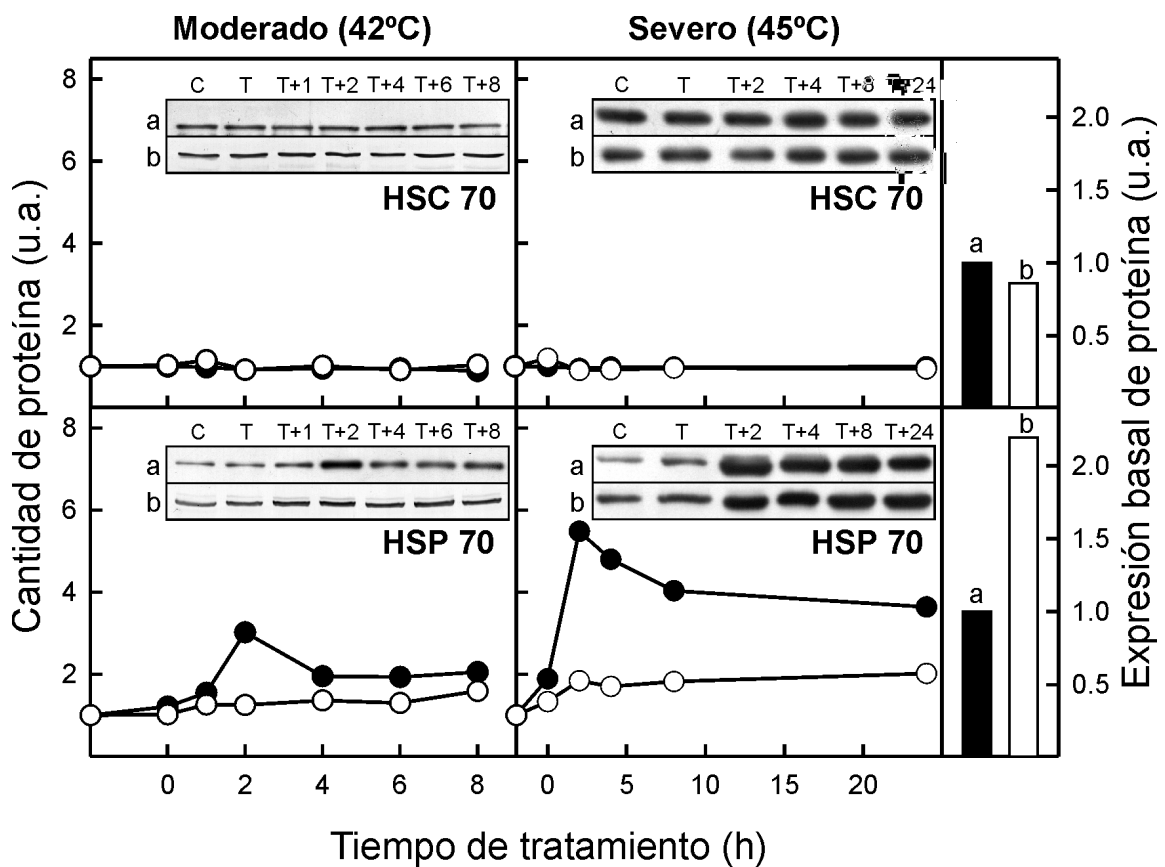


Figura 45.- Efecto del choque térmico moderado y severo en la expresión de HSPs.

Los niveles de proteína de las diferentes HSPs se analizan mediante *Western blot* en ausencia (C) o después de distinto tiempo de tratamiento térmico (T) moderado (42°C) o severo (45°C) y tras dejar distintos tiempos de recuperación a 37°C (T+X). Los análisis se llevan a cabo en condiciones idénticas a las descritas en la figura 43. En la figura se muestran los resultados obtenidos para las células BCS-TC2 (a; punto negro) y BCS-TC2.BR2 (b; punto blanco). El error es inferior al 8% en todos los casos. En la parte de la derecha se comparan los niveles de expresión basales de HSC 70 y HSP 70 de ambas líneas celulares, considerando como 1 el nivel basal de HSP en las células BCS-TC2.

Por otra parte, en las células resistente a butirato, aunque se produce un incremento en los niveles de la HSP 70, éste es considerablemente inferior, se produce algo más tardíamente y se mantiene en el tiempo (Figura 45). Así, tras 24 horas, el incremento es aproximadamente dos veces el del nivel basal. Este hecho podría ser debido a que, como se ha comentado anteriormente el nivel basal de las células BCS-TC2.BR2 es aproximadamente el doble que el de las células parentales. Así, distintos estudios sugieren que la reducción de los niveles de la HSP 70 da lugar a células más susceptibles de muerte celular (Wei y col., 1995), mientras que la sobreexpresión de esta proteína inhibe la activación de determinados mediadores del proceso de apoptosis (Robertson y col., 1997; Creagh y col., 2000), y así previene de la apoptosis inducida por ciertos tipos de estrés. Todos los resultados apuntarían a que el incremento de la HSP 70 observado en las células BCS-TC2.BR2 podría ser responsable de

una mayor tolerancia por parte de estas células. Para comprobar esta hipótesis, se ha procedido a determinar el efecto que ambas condiciones de choque térmico tiene sobre la viabilidad celular. Como se pone de manifiesto en la figura 46, el choque térmico moderado no tiene ningún efecto sobre la viabilidad celular en las células BCS-TC2.BR2 mientras que 48 horas después del tratamiento se aprecia una ligera disminución en las células parentales. El choque térmico en condiciones severas conduce a una disminución muy acusada de la viabilidad celular, siendo ésta más acusada en el caso de las células BCS-TC2 (40% frente a un 20% para las células BCS-TC2.BR2 a las 24 horas después del choque térmico). Estos resultados indican que las células BCS-TC2.BR2 son más resistentes a la muerte celular inducida tanto por hipertermia moderada como severa.

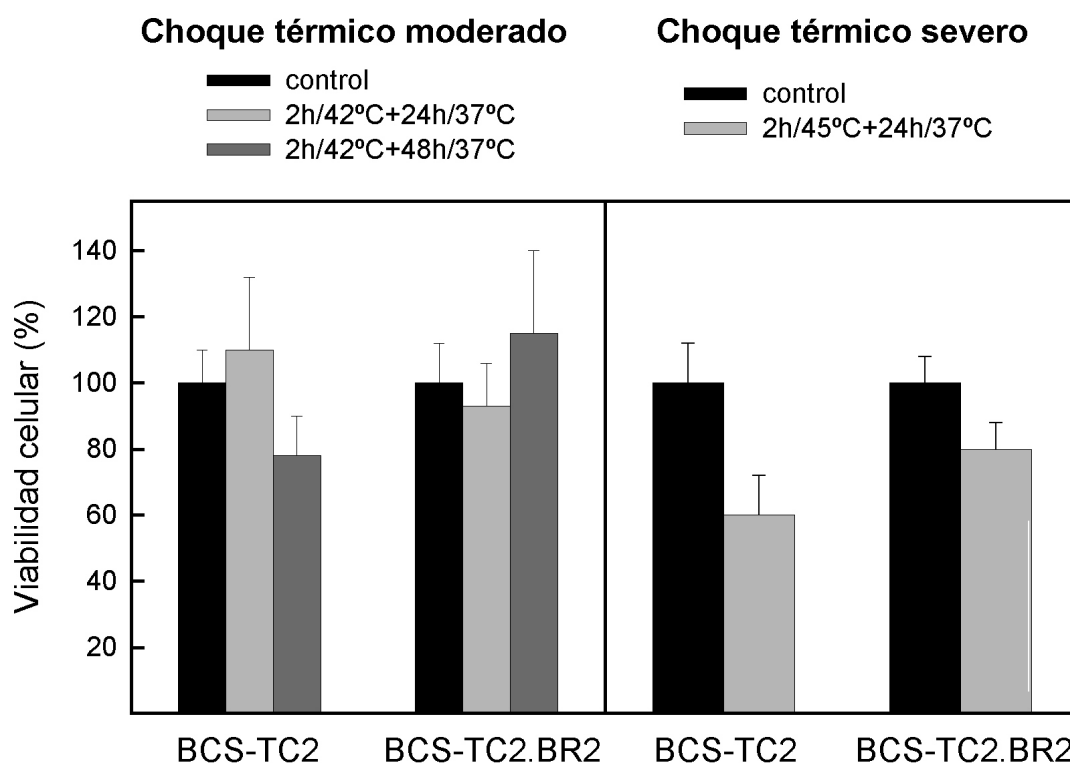


Figura 46. Efecto del choque térmico en la viabilidad celular.

Las células se someten a tratamiento térmico (2h a 42°C o 45°C) y se incuban posteriormente a 37°C durante el tiempo adecuado, tras el cuál se evalúa la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Se considera 100% de viabilidad celular al valor de la absorbancia a 570 nm obtenido para las células control incubadas permanentemente a 37°C.

Efecto del butirato en la expresión de proteínas de choque térmico

Teniendo en cuenta que entre los genes cuya expresión se modula por el butirato se encuentran los que codifican para las proteínas de choque térmico, se ha procedido a analizar si este agente modifica los niveles de estas proteínas en las células BCS-TC2. Para ello se tratan las células durante 48 horas con distintas concentraciones de butirato y se analiza la

expresión de distintas HSPs. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 47 donde se observa una disminución significativa en todas las HSPs en función de la concentración de agente. Estos resultados estarían aparentemente en desacuerdo con los obtenidos para otras líneas celulares (Filippovich y col., 1994; García-Bermejo y col., 1995 y 1997). Así, en las células HL-60 de leucemia, el tratamiento con butirato incrementa los niveles de la HSP 70 y protege a la célula frente al tratamiento térmico posterior disminuyendo el porcentaje de células apoptóticas con respecto a las células que no recibieron tratamiento previo (Filippovich y col., 1994). También, el butirato induce la expresión de la HSP 70 y la HSP 27 y esta expresión va asociada con la diferenciación de las células eritoblastoides H562 (Mevichi y col., 1994) y células promonocíticas U-937 y promielocíticas HL-60 (García-Bermejo y col., 1995, 1997). Así, el butirato, tanto a concentraciones en las que se induce diferenciación como a las que induce apoptosis, incrementa de forma transitoria los niveles de mRNA y de la proteína HSP 70 en células U-937 (García-Bermejo y col., 1997). El hecho de que este incremento sea transitorio y se produzca a tiempos tempranos del tratamiento (3-12 horas), podría justificar que no se observase en este caso. En las células BCS-TC2, la disminución en los niveles de HSPs podría correlacionarse con la apoptosis inducida. Así, estaría en concordancia con los estudios realizados con otros agentes que también inducen apoptosis (quercetina, etopósido y ceramida) los cuales disminuyen la expresión de la HSP 70 con un incremento paralelo del número de células apoptóticas (Sacchi y Sciaffonati, 1996; Kondo y col., 2000).

Además, fundamentalmente en el caso de las HSC 70 y HSP 60, conjuntamente con la disminución de los niveles de proteína se observa que el anticuerpo reconoce proteínas de menor masa molecular que podrían generarse por una degradación proteolítica posiblemente relacionada con el proceso apoptótico. En este sentido se ha descrito que el tratamiento de distintas líneas celulares con etopósido, también inductor de apoptosis, provoca la proteólisis de la GRP 94 (miembro de la familia de las HSPs pero inducible por glucosa) coincidiendo con la activación de la caspasa 3, aunque no es ésta sino la calpaína la responsable de la digestión proteolítica (Reddy y col., 1999).

A diferencia de lo que ocurre en las células parentales, el tratamiento de las células BCS-TC2.BR2 con butirato 4 mM durante 2 ó 4 días, prácticamente no modifica los niveles de las HSC 70, HSP 70 y HSP 27 (Figura 47 B). Este resultado podría estar relacionado con la resistencia a la apoptosis que presentan estas células. En este sentido, numerosos datos apoyan la eficacia de las HSPs en la protección frente al proceso de apoptosis (Samali y Cotter, 1996; Chen y col., 1999; Creagh y col., 2000). Así, el tratamiento térmico de distintos tipos de células incrementa los niveles de las HSP 27, HSP 70 y HSP 90, siendo estas células más resistentes a la apoptosis frente a distintos agentes que aquellas no sometidas a tratamiento térmico (Samali y Cotter, 1996). Mientras, la HSP 27 parece que bloquea la apoptosis mediada por Fas (Mehlen y col., 1996a) o modifica los niveles de especies reactivas de oxígeno (Mehlen y col., 1996b), la HSP 70 actúa a nivel mitocondrial impidiendo la liberación de citocromo c, de calcio y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Creagh y col.,

2000). También inhibe la activación de la caspasa 3 (Creagh y col., 2000), aunque datos previos sugerían que la HSP 70 ejerce sus efectos antiapoptóticos de manera posterior a la activación de las caspasas (Jaättelä y col., 1998). Así, las HSP 70 y HSP 27, al igual que Bcl-2, pueden bloquear la apoptosis inducida por una gran variedad de iniciadores (Samali y col., 1998; Jäättelä, 1999). En general, los mecanismos de protección de la HSP 70 parece que son similares a los de otras proteínas de choque térmico que actúan como caperonas, previniendo la desnaturalización o pérdida del plegamiento de las proteínas (Hightower y col., 1994). Otros sugieren que la HSP 70 previene por su habilidad para colaborar en la transferencia de proteínas recién sintetizadas a la mitocondria, ayudando así al mantenimiento de la integridad mitocondrial (Ungermann C, 1994), o por su capacidad de unión a proteínas proapoptóticas tales como p53 y c-myc.

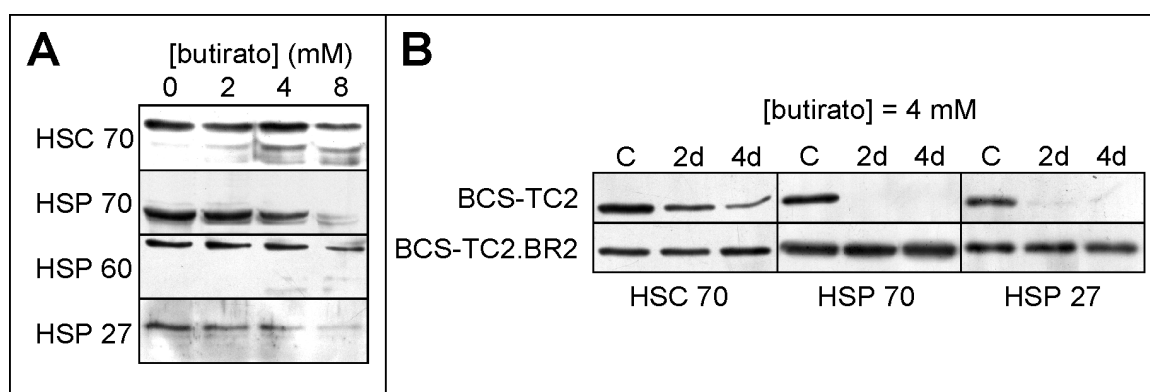


Figura 47.- Efecto del butirato en la expresión de HSPs.

Se siembran 6×10^6 en placas de cultivo de 24 pocillos en medio DMEM completo. Cuando las células se encuentran en fase exponencial, se retira el medio de cultivo y se añade medio fresco en presencia de distintas concentraciones de butirato y se mantiene en estas condiciones durante distintos días. Trascurrido el tiempo adecuado, se recogen las células y se analiza la expresión de distintas HSPs mediante *Western blot* en idénticas condiciones a las descritas en la figura 42. En la parte A, se muestran los resultados obtenidos en las células BCS-TC2 tratadas con distintas concentraciones de butirato durante 48 horas. En la parte B, se muestra la expresión de HSPs tras tratamiento durante distinto tiempo de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 con butirato 4 mM.

4.6 ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS CÉLULAS BCS-TC2, BCS-TC2.BR2 Y SUBLÍNEAS TUMORIGÉNICAS

A raíz de las variaciones observadas en el patrón de expresión de algunas proteínas en las células BCS-TC2 y las células resistentes a butirato, se ha planteado la cuestión de si existen otras proteínas que modifiquen su expresión. Su búsqueda y la identificación de las mismas pueden resultar muy complejas a no ser que se recurra a un análisis global y simultáneo del conjunto de proteínas expresadas en estas células bajo determinadas

condiciones. En este sentido, los análisis proteómicos constituyen una herramienta muy útil para separar con alta resolución, de manera sencilla y rápida el conjunto de proteínas que forman parte de un organismo. Para estos análisis se utiliza la electroforesis bidimensional que, combinada con otros sistemas y bases de datos computerizados, teóricamente permite una rápida comparación, cuantificación e identificación de proteínas celulares.

Este bloque de estudios se ha realizado en colaboración con el Dr. Juan Santarén, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, por su experiencia en el análisis proteómico y por disponer de sistemas que permiten desarrollar al mismo tiempo un número elevado de geles. De este modo, se evitan las posibles diferencias en cuanto a las condiciones de desarrollo electroforéticas. En estos estudios se han evaluado las diferencias en las proteínas biosintetizadas entre distintas líneas celulares para lo cual se marcaron las células con una mezcla de [^{35}S]metionina y [^{35}S]cisteína. Previamente, se determinó el número de células adecuado, momento en que se debía hacer el pulso y la cantidad de radiactividad necesaria para que la incorporación fuese la apropiada y así obtener una buena resolución en los geles. Una vez conocido este dato, se procedió al marcaje, recogida de extractos celulares y desarrollo de la electroforesis bidimensional, todo ellos en idénticas condiciones experimentales, con el fin de poder comparar los resultados obtenidos. En la figura 48 se muestran los mapas de las electroforesis bidimensionales de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 en las condiciones estándar de cultivo.

El análisis por ordenador de las imágenes digitalizadas utilizando el programa PDQuest (versión 6.2.0) permite identificar un total de 1488 y 1272 proteínas marcadas para las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 respectivamente, para un tiempo de exposición de 70 horas. Hay que tener en cuenta que el número de proteínas que se detecta en los fluorogramas es función de la cantidad de radiactividad aplicada por gel y del tiempo de exposición de la película. Así, para un tiempo de exposición de 34 horas, el número de proteínas detectadas disminuye hasta 772 y 602 para las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2, respectivamente. En este sentido, la elección de la cantidad de radiactividad aplicada y el tiempo de exposición de la película son esenciales para la obtención de una imagen con una buena resolución. En general, los análisis proteómicos recogidos en la bibliografía muestran un número comprendido entre 900 y 2500 proteínas (Stulík y col., 1999; Cole y col., 2000).

Para que no existan dudas en los cambios cualitativos (presencia o ausencia) y cuantitativos (incremento o disminución) en la expresión de una proteína, se deben tener en cuenta distintos tiempos de exposición de un mismo fluorograma. En la figura 49 se recoge un área de los fluorogramas donde se pueden observar algunas de las principales diferencias en las proteínas biosintetizadas en condiciones estándar de cultivo de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2. Se muestran tres tiempos de exposición de las películas fotográficas para poder definir con claridad los cambios cualitativos y cuantitativos.

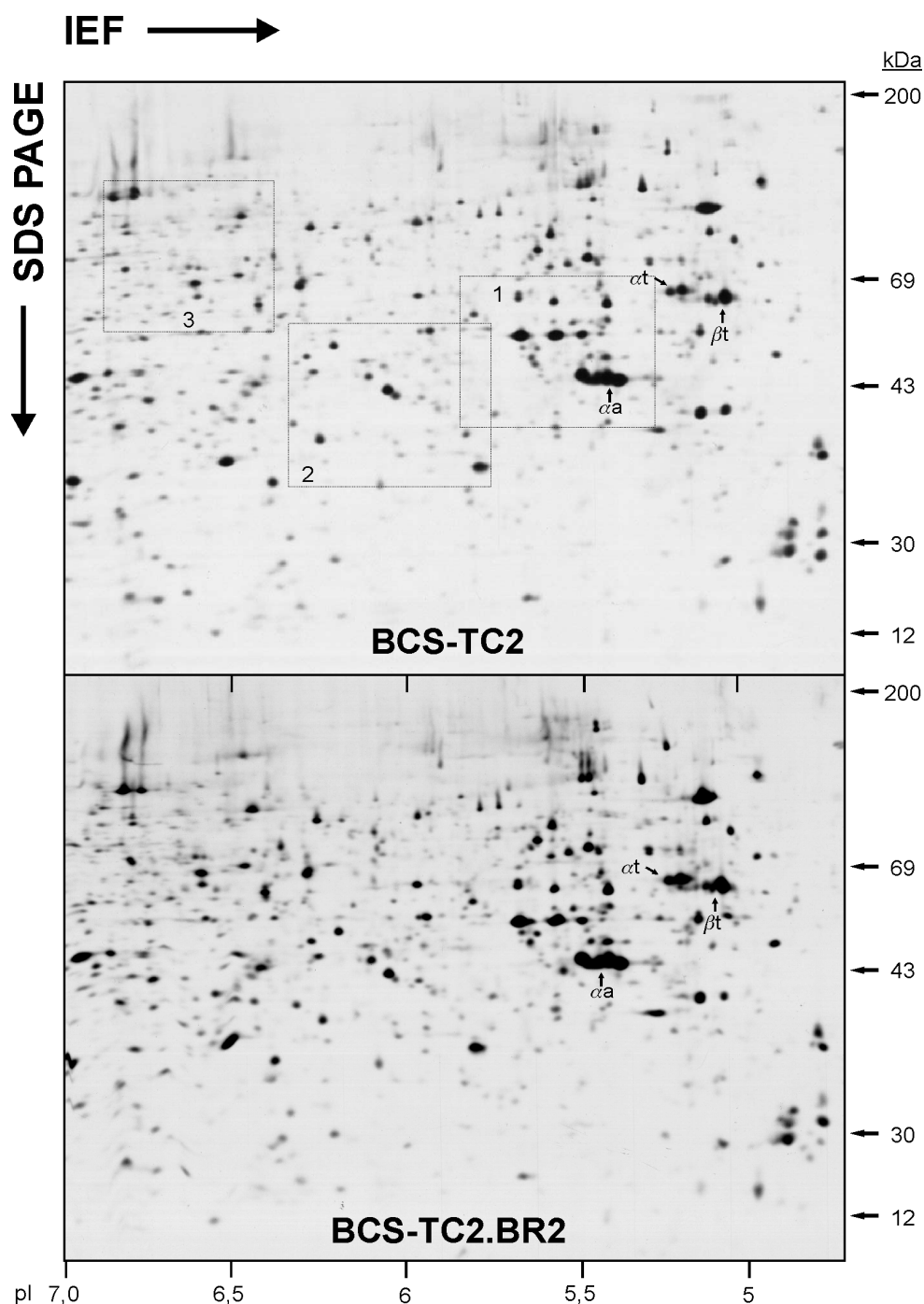


Figura 48.- Electroforesis bidimensional de las proteínas marcadas con ^{35}S en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.

Se siembran 10^4 células en placas de cultivo de 24 pocillos de superficie de crecimiento en medio DMEM completo. Cuando se encuentran en fase exponencial, se retira el medio de cultivo y se añade medio completo sin metionina ni cisteína, y suplementado con 200 Ci de una mezcla de $[^{35}\text{S}]$ metionina y $[^{35}\text{S}]$ cisteína. Tras 2 horas de incubación, los extractos celulares se recogen por raspado, se liofilizan y se toman 10^6 cpm de proteínas marcadas para su separación por electroforesis bidimensional (IEF) como se describe en Materiales y Métodos. En la figura se recogen los fluorogramas obtenidos tras un tiempo de exposición de 34 horas. a: -actina; t: -tubulina; t: -tubulina

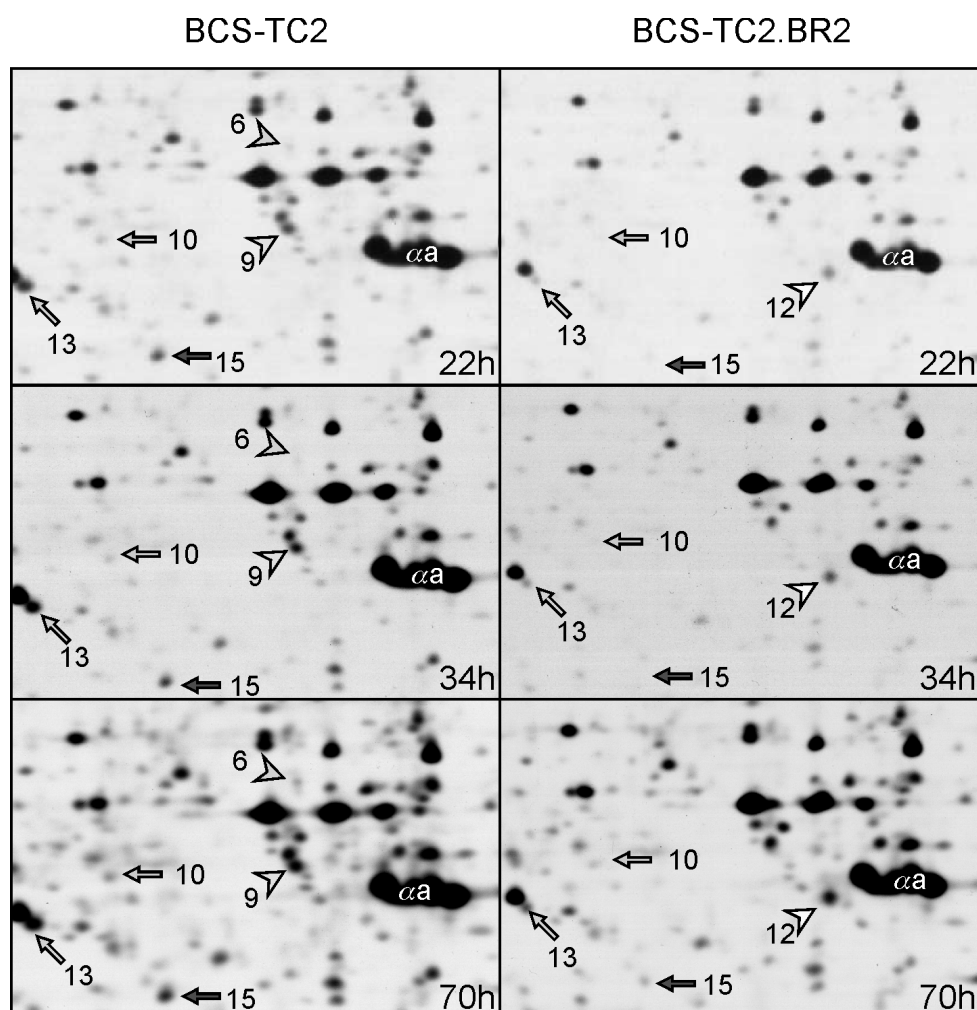


Figura 49.- Detalle de una región de los fluorogramas de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.

En la figura se muestra la misma área (zona 1) de los fluorogramas de las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2 a 3 tiempos distintos de exposición de las películas fotográficas (22, 34 y 70 horas). Con puntas de flecha se han marcado las principales diferencias cualitativas, y con flechas, las cuantitativas, junto con el correspondiente número asignado que se recoge en la tabla X. αa : -actina.

Con el fin de establecer diferencias, las proteínas se han numerado considerando su masa molecular y punto isoelectrico. Comparando en cada caso los tiempos de exposición y, posteriormente, analizando las diferencias acontecidas en ambas líneas celulares, se pueden definir, al menos, 17 cambios significativos. De todos estos cambios, 6 de ellos corresponden a proteínas sólo presentes en las células BCS-TC2 (proteínas nº 1, 2, 3, 5, 6 y 9) y otros 3, son específicos de las células BCS-TC2.BR2 (proteínas nº 4, 8 y 12). Los restantes cambios corresponden a diferencias cuantitativas en proteínas presentes en ambas muestras. En la tabla X se recogen las masas moleculares y el punto isoelectrico de las proteínas que se modifican, así como las diferencias cualitativas y las cuantitativas normalizadas frente a los niveles de α -actina y los de β -tubulinas, como se describe en Materiales y Métodos. La cuantificación se ha llevado a cabo utilizando el sistema PDQuest.

Tabla X.- Coordenadas de las principales proteínas biosintetizadas en las que se observan cambios entre las células BCS-TC2 y BCS-TC2.BR2.

Nº	Masa molecular (kDa)	pI	Cuantificación (%)	
			BCS-TC2	BCS-TC2.BR2
1	115,9	6,77	2	-
2	114,0	6,54	+	-
3	97,9	6,50	+	-
4	82,8	6,80	-	2
5	80,0	6,30	+	-
6	77,4	5,63	+	-
7	70,0	6,35	100	13
8	62,1	5,09	-	+
9	55,3	5,64	100	-
10	53,5	5,92	100	9
11	52,9	6,79	100	7
12	50,0	5,55	-	+
13	49,9	6,02	100	14
14	41,7	6,18	100	13
15	41,7	5,84	100	8
16	35,7	5,19	100	9
17	24,6	4,80	100	4
-actina	50,7	5,5-5,4		
-tubulina	70,6	5,25		
-tubulina	68,1	5,09		

Nº: número asignado a la proteína; Masa molecular en kDa; pI: punto isoelectrico. Las diferencias cualitativas se representan con los signos + y - para indicar presencia o ausencia de la proteína, respectivamente. Los cambios cuantitativos se expresan como porcentaje considerando el 100% el mayor valor obtenido en la cuantificación realizada con el programa PDQuest

Para poder correlacionar estos cambios con distintos parámetros celulares (grado de diferenciación, capacidad tumorigénica, etc.) se analizaron también, en las mismas condiciones de cultivo, extractos obtenidos de las sublíneas tumorigénicas BCS-TC2.2, BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FNH obtenidas a partir de las células BCS-TC2 por selección *in vivo* con componentes de la matriz extracelular y cuyas características se recogen en la tabla VIII (López-Conejo y col., 1996; López-Conejo y col., 2001). Los resultados se muestran en la figura 50.

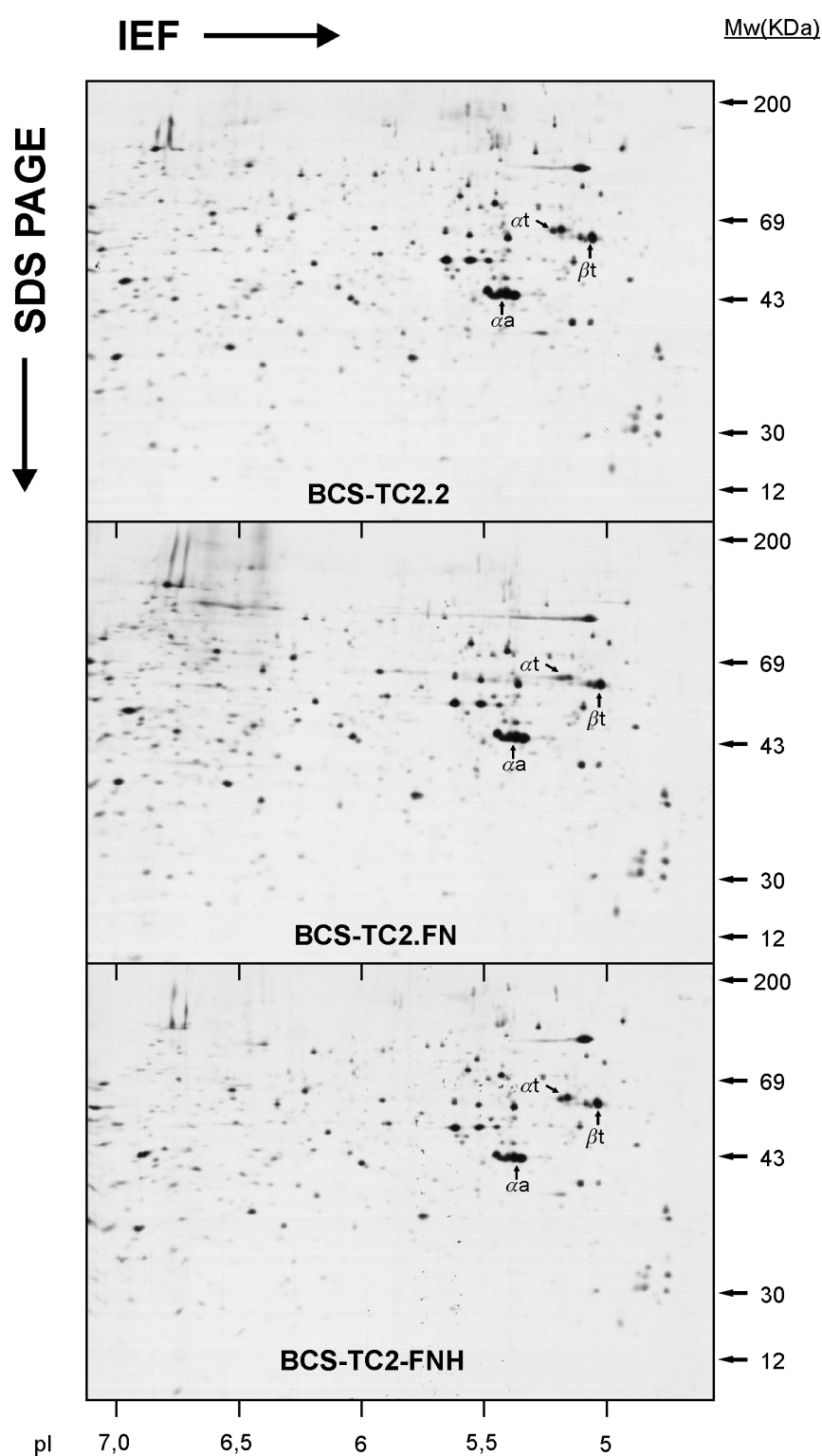


Figura 50.-Electroforesisbidimensional de las proteínas marcadas con ^{35}S en las células BCS-TC2.2, BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FNH.

Las condiciones del análisis proteómico son idénticas a las descritas en el pie de la figura 48. La migración de la α -actina (αa), α -tubulina (αt) y β -tubulina (βt) se indican con flechas en cada uno de los fluorogramas.

Dentro de los cambios cualitativos, cabe destacar que las proteínas número 6 y 9 sólo se detectan en las células parentales BCS-TC2 mientras que la proteína 12 aparece sólo en las sublíneas tumorigénicas, entre que las que se incluyen las células BCS-TC2.BR2 (Figura 51, zona 1). La ausencia o presencia de estas proteínas podría correlacionarse con la represión o adquisición del fenotipo tumorigénico respectivamente. Su identificación puede ser de gran utilidad ya que podrían constituir marcadores de la progresión tumoral. Los escasos análisis encontrados en la literatura en los que se comparan muestras de mucosa colónica normal, pólipos y carcinomas podrían resultar de gran ayuda en la identificación de estas proteínas. Se han descrito cambios específicos característicos de la matriz celular en células de colon y tejido tumoral. De las proteínas aisladas de la matriz nuclear, se han identificado al menos 6 de ellas en el 100% de los 18 tumores analizados sin detectarse en ninguna de las 10 muestras de colon normal (Keese y col., 1994). Por otro lado, se han identificado 3 proteínas, la L-FABP (variante hepática de la proteína de unión de ácidos grasos), la SM22- (proteína de unión de actina de músculo liso) y la COX-2 cuya expresión se reduce en tejidos neoplásicos comparados con los de mucosa de colon normal, mientras que 4 miembros de la familia de proteínas de unión de calcio (S100) y la HSP 70 se encuentran sobreexpresados (Stulík y col., 1999). En otro estudio se han identificado 64 proteínas con diferencias cuantitativas entre los perfiles obtenidos de colon normal y de pólipos colónicos; la expresión de 60 de ellas se encuentra reprimida en los pólipos mientras que las otras cuatro se sobreexpresan. Dentro de las proteínas cuya expresión disminuye, se ha identificado a un nuevo miembro de la familia de la glutatión S-transferasa, la isoforma γ y a la anhidrasa carbónica I, que participa en la reabsorción de iones en el lumen intestinal. Además, a diferencia del trabajo de Keese y col. (1994), no se han encontrado diferencias en la expresión de L-FABP entre tejidos de colon normal y pólipos (Cole y col., 2000). Todos estos estudios tienen gran importancia ya que la identificación simultánea de distintas proteínas asociadas específicamente a tumores podría agilizar el diagnóstico y el posible tratamiento de pacientes con cáncer de colon. Sin embargo, al intentar identificar alguno de estos cambios en los fluorogramas de las distintas líneas celulares objeto de estudio comparando los valores de migración de cada proteína particular, no ha sido posible. En algunos casos, resulta hasta complejo comparar valores de migración entre diferentes sublíneas, como en el caso de las células de colon LIM1215 y LIM1863 (Ji y col., 1994 y 1997).

Por otro lado, la expresión de las proteínas número 2, 4 y 8 es específica de las células BCS-TC2.BR2, no encontrándose ni en las células parentales BCS-TC2 ni en las sublíneas tumorigénicas. Dado que no se ha evaluado el efecto del butirato sobre las sublíneas tumorigénicas, no se puede establecer una correlación obvia entre la presencia de estas 3 proteínas y el fenotipo resistente a apoptosis de las células BCS-TC2.BR2, aunque tampoco se descarta su participación. En la literatura, no se ha encontrado ningún análisis bidimensional de líneas celulares resistentes a butirato; no obstante, en células de leucemia K562 tratadas con este agente se aprecia un incremento generalizado en la expresión total de proteínas (de acuerdo con lo ya comentado acerca del efecto del butirato en la modulación de la expresión de proteínas) y se han identificado dos de las proteínas sobreexpresadas, la HSP 28 y la HSP

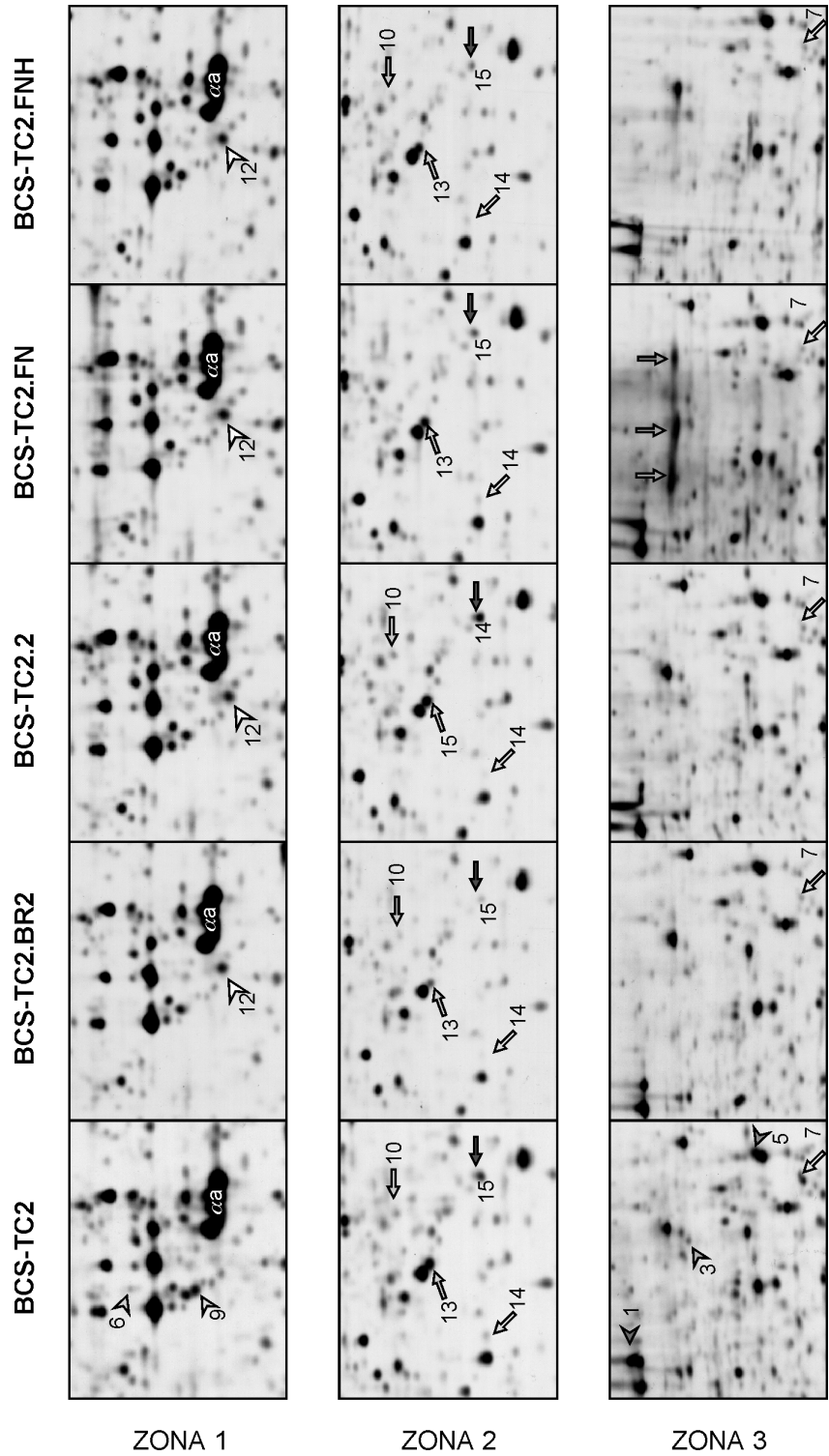


Figura 51.- Detalle de los fluorogramas de las distintas líneas celulares.
Se muestran 3 áreas ampliadas a un tiempo de exposición de 70 horas. Con puntas de flecha se han marcado las principales diferencias cualitativas, y con flechas, las cuantitativas, junto con el correspondiente número asignado a la proteína. a: -actina.

70 (Mivechi y col., 1994). Ésta última también se sobreexpresa en las células BCS-TC2.BR2 cuando se las compara con las parentales aunque, también se ha observado esta modificación en las muestras correspondientes a algunas de las sublíneas tumorigénicas. Dentro de las propias sublíneas tumorigénicas también existen diferencias. Así, por ejemplo, en la zona 3 de la figura 51 se han marcado con flechas un grupo de proteínas que es totalmente específico de las células BCS-TC2.FN. Aparecen también diferencias cuantitativas en las proteínas 13 y 15 y (Figura 51, zona 2). Los niveles de ambas están reducidos en las células BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FNH con respecto a las células BCS-TC2.2. A diferencia de éstas, las células BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FNH presentan polarización celular, por lo que ambas proteínas podrían estar implicadas en procesos de represión de la diferenciación.

La identificación del grupo de proteínas modificadas en las distintas líneas celulares, algunas de ellas probablemente asociadas al fenotipo tumorigénico, a la resistencia a apoptosis o a procesos de diferenciación, se abordó, en una primera tentativa, buscando posibles candidatos en la base de datos SWISS-PROT utilizando el programa *TagIdent* (www.expasy.ch/cgi-bin/tagident0.pl). Este programa localiza proteínas concretas (dentro de un banco de datos de 94.152 proteínas identificadas hasta la fecha) en función del punto isoelectrico y la masa molecular. Resulta curioso que dentro de los posibles candidatos para la proteína 9, sólo presente en las células BCS-TC2, aparezca la desacetilasa de histonas tipo 2. Su presencia sólo en estas células, podría explicar el efecto atenuado que ejerce el butirato sobre las células BCS-TC2.BR2 siendo capaces de crecer en ausencia de una de las principales actividades enzimáticas inhibidas por el butirato. Su ausencia también en las sublíneas permitiría predecir un efecto nulo del butirato sobre ellas. También llama la atención que uno de los candidatos sugeridos para la proteína 12 sea la subunidad catalítica tipo B de la acetiltransferasa de histonas. Esta proteína aparece sólo en las sublíneas tumorigénicas, incluidas las células BCS-TC2.BR2. La ausencia de la desacetilasa de histonas junto con la expresión de la acetiltransferasa de histonas ausente en las células parentales implicaría un estado hiperacetilado de las histonas asociadas al DNA de estas células, pudiendo provocar cambios en el patrón de expresión de proteínas. Sin embargo, este no parece ser el caso, ya que solo se detectan 17 cambios significativos. De todos modos, la migración de una proteína en los geles bidimensionales o los valores de masa molecular y pI normalmente difieren de los calculados teóricamente. Es más, los mismos autores pueden dar valores diferentes para una misma proteína en dos geles distintos; por ejemplo, para la α -actina 43/3,7-5,0 y 48/6,2 (masa molecular en kDa/pI) (Ji y col., 1994 y 1997). Por tanto, todos estos datos son meramente especulativos ya que, aunque el punto isoelectrico y la masa molecular pueden ser orientativos del tipo de proteína, es necesaria la aplicación de otras técnicas para la identificación inequívoca de una proteína dada. En un futuro, la identificación de todas ellas podría permitir describir nuevos marcadores de la progresión tumoral facilitando el diagnóstico y tratamiento del cáncer de colon.

CONCLUSIONES

1. El butirato induce, en las células BCS-TC2, diferenciación terminal incrementándose la actividad de fosfatasa alcalina. La subsiguiente inducción de apoptosis en estas células conlleva alteraciones en el potencial de membrana, en la producción de especies reactivas de oxígeno y en la actividad de la caspasa 3.
2. El tratamiento continuado con butirato 2 mM permite seleccionar y establecer en cultivo la sublínea celular BCS-TC2.BR2. El grado de diferenciación de estas células es ligeramente superior al de las células parentales, presentando un fenotipo principalmente absortivo. Mientras que el butirato mantiene su capacidad para inducir diferenciación sobre las células BCS-TC2.BR2, éstas son poco sensibles a sus efectos apoptóticos, sugiriendo la existencia de un bloqueo en una etapa previa a la activación de caspasa 3. La resistencia a butirato en estas células no es de carácter reversible.
3. Ambos tipos de células son capaces de proliferar como esferoides; el butirato induce menor grado de diferenciación cuando las células proliferan formando este tipo de agregados multicelulares. A diferencia de las células parentales, las células BCS-TC2.BR2 tienen capacidad tumorigénica, lo que no se correlaciona con diferencias muy significativas en los niveles de MMP-2 y MMP-9. Sin embargo, el butirato induce la expresión de MMP-9 y de estromelina 3, siendo este efecto considerablemente más acusado en las células BCS-TC2.
4. Las células BCS-TC2.BR2 son menos sensibles a la apoptosis inducida por la eliminación de la glucosa del medio de cultivo. En ausencia de glucosa, ambos tipos de células utilizan el butirato como fuente alternativa de energía. Las células BCS-TC2 expresan mayores niveles que las células resistentes de los transportadores GLUT1 y GLUT4, lo que podría dar cuenta del diferente efecto ejercido por el butirato en presencia de glucosa sobre ambos tipos celulares. La eliminación de la glucosa y el tratamiento con butirato incrementa los niveles de GLUT1. Se ha establecido una relación inversa entre los niveles de GLUT 1 y la capacidad tumorigénica en ese tipo de células.
5. Los estudios de hipertermia y de choque térmico ponen de manifiesto una mayor termotolerancia de las células BCS-TC2.BR2, pudiendo relacionarse con los mayores niveles de HSP 70 en estas células. El tratamiento con butirato disminuye los niveles de las HSC 70, HSP 70, HSP 60 y HSP 27 en las células BCS-TC2 lo que podría estar relacionado con la inducción de apoptosis. No se observa modificación significativa en estas proteínas en las células BCS-TC2.BR2 tras el tratamiento con butirato.
6. La comparación de los mapas de electroforesis bidimensional permite detectar diferencias en la biosíntesis de algunas proteínas entre las células parentales y las resistentes a butirato.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad M.S., Krishnan S., Ramakrishna B.S., Mathan M., Pulimood A.B. y Murthy S.N. (2000) "Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice". *Gut* **46**: 493-9.
- Ahmed N. y Berridge M.V. (1999) "N-glycosylation of glucose transporter-1 (Glut-1) is associated with increased transporter affinity for glucose in human leukemic cells". *Leuk Res.* **23**: 395-401.
- Ahnen D.J. (1996) "The genetic basis of colorectal cancer risk". *Adv Intern Med.* **41**: 531-52.
- Albini A., Melchiori A., Santi S *et al.* (1991) "Tumour cell invasion inhibited by TIMP-2" *Natl Cancer Inst* **83**:775-779.
- Aloj L., Caraco C., Jagoda E., Eckelman W.C. y Neumann R.D. (1999) "Glut-1 and hexokinase expression: relationship with 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake in A431 and T47D cells in culture". *Cancer Res.* **59**: 4709-14.
- Aparicio T., Kermorgant S., Lewin M.J. y Lehy T. (1998) "Effects of HGF on the production of matrix metalloproteinases by colonic cancer cells DHD/K12". *C R Seances Soc Biol Fil.* **192**: 311-5.
- Archer S.Y., Meng S., Shei A. y Hodin R.A. (1998) "p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6791-6.
- Arrigo A.P. (1990) "Tumor necrosis factor induces the rapid phosphorylation of the mammalian heat shock protein hsp28". *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1276-1280.
- Arrigo A.P. y Landry J. (1994) "Expression and function of the low-molecular-weight heat shock protein". En: *The Biology of heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos, C., eds) pp. 335-373, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Arts J., Lansink M., Grimbergen J., Toet K.H. y Kooistra T. (1995) "Stimulation of tissue-type plasminogen activator gene expression by sodium butyrate and trichostatin A in human endothelial cells involves histone acetylation". *Biochem J.* **310**: 171-6.
- Asano T., Katagiri H., Takata K., Lin J.L., Ishihara H., Inukai K., Tsukuda K., Kikuchi M., Hirano H., Yazaki Y. y col. (1991) "The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity". *J Biol Chem.* **266**: 24632-6.
- Athanassiadou P., Petrakakou E., Sakelariou V., Zerva Ch., Liossi A., Michalas S. y Athanassiades P. (1998) "Expression of p53, bcl-2 and heat shock protein (hsp72) in malignant and benign ovarian tumours". *European Journal of Cancer Prevention* **7**: 225-231.
- Augeron C. y Labois CL. (1984) "Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate". *Cancer Res.* **44**: 3961-9.
- Bardella L., Cajone F., Cairo G., Schiaffonati L. y Bernelli-Zazzera A. (1986) "Synthesis of heat-shock proteins and tumor growth" *Toxicol. Pathol.* **14**: 353-356.
- Barshishat M., Polak-Charcon S. y Schwartz B. (2000) "Butyrate regulates E-cadherin transcription, isoform expression and intracellular position in colon cancer cells". *Br J Cancer* **82**:195-203.
- Bartram H.P., Scheppach W., Schmid H., Hofmann A., Dusel G., Richter F., Richter A. y Kasper H. (1993) "Proliferation of human colonic mucosa as an intermediate biomarker of carcinogenesis: effects of butyrate, deoxycholate, calcium, ammonia, and pH". *Cancer Res.* **53**: 3283-8.
- Basset P., Bellocq J.P., Lefebvre O., Noel A., Chenard M.P., Wolf C., Anglard P. y Rio M.C. (1997) "Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression". *Crit Rev Oncol Hematol.* **26**: 43-53.
- Basset P., Bellocq J.P., Wolf C *et al.* (1990) "A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas" *Nature* **348**:699-704
- Basset P., Wolf C., Rouyer N., Bellocq J.P., Rio M.C. y Chambon P. (1994) "Stromelysin-3 in stromal tissue as a control factor in breast cancer behavior". *Cancer* **74**: 1045-9.
- Beck S.C., Paidas C.N., Mooney M.L., Deitch E.A. y De Maio A. (1995a) "Presence of the stress-inducible form of hsp-70 (hsp-72) in normal rat colon". *Shock* **3**:398-402.
- Beck S.C., Paidas C.N., Tan H., Yan, J. y De Maio A. (1995b) "Depressed expression of the inducible form of HSP 70 (HSP 72) in brain and heart after in vivo heat shock". *Am. J. Physiol.* **269**: 608-613.

- Bedi A., Pasricha P.J., Akhtar A.J., Barber J.P., Bedi G.C., Giardiello F.M., Zehnbaue r B.A., Hamilton S.R. y Jones R.J. (1995). "Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer". *Cancer Res* **55**:1811-6.
- Bedne E., Li X., Gorczyca W., Melamed M.R. y Darzynkiewicz Z. (1999) "Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry". *Cytometry* **35**:181-95.
- Binder C., Binder L., Kroemker M., Schulz M. y Hiddemann W. (1997) "Influence of cycloheximide-mediated downregulation of glucose transport on TNF alpha-induced apoptosis". *Exp Cell Res.* **236**: 223-30.
- Birkedal-Hansen H. (1995) "Proteolytic remodeling of extracellular matrix" *Curr Opin Cell Biol* **7**: 728-735.
- Boffa L.C., Gruss R.J., Allfrey V.G. (1981) "Manifold effects of sodium butyrate on nuclear function. Selective and reversible inhibition of phosphorylation of histones H1 and H2A and impaired methylation of lysine and arginine residues in nuclear protein fractions". *J Biol Chem.* **256**: 9612-21.
- Bradford M.M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal Biochem* **64**:624-627.
- Buisson A.C., Gilles C., Polette M., Zahm J.M., Birembaut P. y Tournier J.M. (1996) "Wound repair-induced expression of a stromelysin is associated with the acquisition of a mesenchymal phenotype in human respiratory epithelial cells". *Lab Invest.* **74**: 658-69.
- Bukau B. y Horwich A.L. (1998) "The hsp70 and hsp60 chaperone machine". *Cell* **92**: 351-366.
- Burel C., Mezger V., Pinto M., Rallu M., Trigon S. y Morange M. (1992) "Mammalian heat shock protein families. Expression and functions". *Experientia* **48**: 629-634.
- Burkitt D.P. (1971) "Epidemiology of cancer of the colon and rectum". *Cancer* **28**: 3-13.
- Butzner J.D., Parmar R., Bell C.J. y Dalal V. (1996) "Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat". *Gut* **38**: 568-73.
- Carlsson J., Nilsson K., Westermar k B., Ponten J., Sundstrom C., Larsson E., Bergh J., Palman S., Busch C. y Collins P. (1983) "Formation and growth of multicellular spheroids of human origin". *Int. J. Cancer* **31**: 523-533.
- Cavaliere F., D'Ambrosi N., Sancesario G., Bernardi G. y Volonte C. (2001) "Hypoglycaemia-induced cell death: features of neuroprotection by the P2 receptor antagonist basile n blue". *Neurochem Int.* **38**: 199-207.
- Chai F., Evdokiou A., Young G.P. y Zalewski P.D. (2000) "Involvement of p21 (Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate". *Carcinogenesis.* **21**: 7-14.
- Chen L.B. y Rivers EN (1990), "Mitochondria in cancer cells". *Genes and Cancer* 127-135. Editado por Carney D. y Sikora K.
- Chenard M.P., O'Siorain L., Shering S., Rouyer N., Lutz Y., Wolf C., Basset P., Bellocq J.P. y Duffy M.J. (1996) "High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma". *Int J Cancer* **69**: 448-51.
- Chomczynski P. y Sacchi N. (1987) "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction" *Anal Biochem* **162**: 156-159.
- Chung D.H., Zhang F., Chen F., McLaughlin W.P. y Ljungman M. (1998) "Butyrate attenuates BCLX(L) expression in human fibroblasts and acts in synergy with ionizing radiation to induce apoptosis." *Radiat Res.* **149**: 187-94.
- Ciocca D.R., Oesterreich S., Chamnes G.C., McGuire W.L. y Fuqua S.A.W. (1993) "Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (HSP27): a review". *J. Natl. Cancer Inst.* **85**: 1558-1570
- Clausen M.R. (1995) "Butyrate and colorectal cancer in animals and in humans" (mini-symposium: butyrate and colorectal cancer). *Eur J Cancer Prev.* **4**: 483-90.
- Coffey R.J., Goustin A.S., Soderquist A.M., Shipley G.D., Wolfshohl J., Carpenter G. y Moses H.L. (1987) *Cancer Res* **47**: 4590-4594.
- Cole A.R., Ji H. y Simpson R.J. (2000) "Proteomic analysis of colonic crypts from normal, multiple intestinal neoplasia and p53-null mice: a comparison with colonic polyps". *Electrophoresis* **21**: 1772-81.
- Collett E.D., Davidson L.A., Fan Y.Y., Lupton J.R. y Chapkin R.S. (2001) "n-6 and n-3 polyunsaturated fatty

- acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes". *Am J Physiol Cell Physiol.* **280**: C1066-75.
- Csordas A. (1990) "On the biological role of histone acetylation". *Biochem J.* **265**: 23-38.
- Csordas A. (1996) "Butyrate, aspirin and colorectal cancer". *Eur J Cancer Prev.* **5**: 221-31.
- Cummings JH. (1998) "Dietary carbohydrates and the colonic microflora". *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **1**: 409-14.
- Cummings J.H. y Macfarlane G.T. (1997) "Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism". *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* **21**: 357-65.
- Daniel P., Brazier M., Cerutti I., Pieri F., Tardivel I., Desmet G., Baillet J. y Chany C. (1989) "Pharmacokinetic study of butyric acid administered in vivo as sodium and arginine butyrate salts". *Clin Chim Acta.* **181**: 255-63.
- Daniel (siglo VI, A.C.). Biblia, libro de Daniel 1, 3-16.
- Daniel P., Louis M. y Pieri F. (1983) "Bladder papilloma. Treatment with interferon, sodium butyrate and isoprinosine". *Presse Med.* **12**: 1304-5.
- Darcy-Vrillon B., Cherbuy C., Morel M.T., Durand M. y Duee P.H. (1996) "Short chain fatty acid and glucose metabolism in isolated pig colonocytes: modulation by NH_4^+ ". *Mol Cell Biochem.* **156**: 145-51.
- Davidson M.H. y McDonald A. (1998) "Fiber: forms and functions" *Nutrition Res* **18**: 617-624.
- Davidson S., Ho J.P., Gabriele T. y Anderson R.L. (1995) "In vivo growth of a murine lymphoma cell line alters regulation of expression of hsp72". *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1071-1078.
- De Benedetti K., Varesco L., Pellegata N.S. y col (1994) "Genetic events in sporadic colorectal adenomas: K-ras and p53 heterozygous mutations are not sufficient for malignant progression" *Anticancer Res* **13**: 667-670.
- DeClerck Y.A., Yean T.D., Chan D., Shimada H. y Langley K.E. (1991) "Inhibition of tumor invasion of smooth muscle layers by recombinant human metalloproteinase inhibitor" *Cancer Res* **51**: 2151-2157.
- DeMarini D.M. (1998) "Dietary interventions of human carcinogenesis". *Mutat Res.* **400**: 457-65.
- Ding H.F. y Fisher D.E. (1998) "Mechanisms of p53-mediated apoptosis". *Crit Rev Oncog.* **9**: 83-98.
- Doll R. y Peto R. (1981) "The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today". *J Natl Cancer Inst.* **66**: 1191-308.
- Duan H., Dixit V.M. (1997) "RAIDD is a new 'death' adaptor molecule". *Nature* **385**: 86-9.
- Dulbecco R. (1970) "Topinhibition and serum requirement of transformed and untransformed cells" *Nature* **227**: 802-806.
- Dunn M.J. y Corbett J.M. (1996) "Two-dimensional polyacrylamide gelelectrophoresis". *Methods Enzymol.* **271**: 177-203.
- Emenaker N.J. y Basson M.D. (1998) "Short chain fatty acids inhibit human (SW1116) colon cancer cell invasion by reducing urokinase plasminogen activator activity and stimulating TIMP-1 and TIMP-2 activities, rather than via MMP modulation". *J Surg Res.* **76**: 41-6.
- Engers R., Gerharz C.D., Donner A., Mrzyk S., Krause-Paulus R., Petek O. y Gabbert H.E. (1999) "In vitro invasiveness of human epithelioid-sarcoma cell lines: association with cell motility and inverse correlation with the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases". *Int J Cancer* **80**: 406-12.
- Esteller M., Tortola S., Toyota M., Capella G., Peinado M.A., Baylin S.B. y Herman J.G. (2000) "Hypermethylation-associated inactivation of p14 (ARF) is independent of p16 (INK4a) methylation and p53 mutational status". *Cancer Res.* **60**: 129-33.
- Fagot D., Buquet-Fagot C., Lallemand F. y Mester J. (1994) "Antiproliferative effects of sodium butyrate in adriamycin-sensitive and -resistant human cancer cell lines". *Anticancer Drugs* **5**: 548-56.
- Faleiro L., Kobayashi R., Fearnhead H. y Lazebnik Y. (1997) "Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells". *EMBO J.* **16**: 2271-81.
- Fearon E.R. y Vogelstein B. (1990) "A genetic model for colorectal tumorigenesis". *Cell* **61**: 759-67.

- Fearon E.R., Cho K.R., Nigro J.M., Kern S.E., Simons J.W., Ruppert J.M., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Thomas G. y Kinzler K.W., et al. (1990) "Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers". *Science*. **247**: 49-56.
- Feige U. y Polla B.S. (1994) "Heat shock protein: the hsp70 family". *Experientia*. **50**: 979-986.
- Fernández-Resa P., Mira E. y Quesada A.R. (1995) "Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases" *Annal Biochem* **224**:434-435.
- Ferrarini M., Helatai S., Zocchi M.R. y Rugarli C. (1993) "Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cancer cells". *Int. J. Cancer* **51**: 613-619.
- Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J.F., Dougherty B.A. y Merrick J.M., et al. (1995) "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd". *Science* **269**: 496-512.
- Fleming H., Begley M., Campi T., Condon R., Dobyns K., McDonagh J. y Wallace S. (1995) "Induction of heat labile alkaline phosphatase by butyrate in differentiating endometrial cells". *J Cell Biochem*. **58**: 509-16.
- Flier J.S., Mueckler M.M., Usher P. y Lodish H.F. (1987) "Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes". *Science* **235**: 1492-5.
- Franceschi S., Favero A., Parpinel M., Giacosa A. y La Vecchia C. (1998) "Italian study on colorectal cancer with emphasis on influence of cereals". *Eur J Cancer Prev*. **7**: S19-23.
- Freeman H.J. (1986) "Effects of differing concentrations of sodium butyrate on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat intestinal neoplasia". *Gastroenterology* **91**: 596-602.
- Frommel TO, Coon JS, Tsuruo T, Roninson IB. (1993) "Variable effects of sodium butyrate on the expression and function of the MDR1(P-glycoprotein) gene in colon carcinoma cell lines". *Int J Cancer* **55**: 297-302
- Gamet L., Daviaud D., Denis-Pouxviel C., Remesy C. y Murat J.C. (1992) "Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29". *Int J Cancer* **52**: 286-9.
- García-Bermejo L, Vilaboa N.E., Pérez C., Galán A., de Blas E. y Aller P. (1997) "Modulation of heat-shock protein 70 (HSP70) gene expression by sodium butyrate in U-937 promonocytic cells: relationships with differentiation and apoptosis". *Exp Cell Res*. **236**: 268-74.
- García-Bermejo L, Vilaboa N.E., Pérez C., de Blas E., Calle C. y Aller P. (1995) "Modulation of HSP70 and HSP27 gene expression by the differentiation inducer sodium butyrate in U-937 human promonocytic leukemia cells". *Leuk Res*. **19**:713-8.
- Giardina C. y Inan M.S. (1998) "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids, and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells". *Biochim Biophys Acta* **1401**: 277-88.
- Gibson P.R., Moeller I., Kagelari O., Folino M. y Young G.P. (1992) "Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro". *J Gastroenterol Hepatol*. **7**: 165-72.
- Gibson P.R., Rosella O., Wilson A.J., Mariadason J.M., Rickard K., Byron K., Barkla D.H. (1999) "Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate". *Carcinogenesis* **20**: 539-44.
- Gibson P.R., Moeller I., Kagelari O., Folino M. y Young G.P. (1992) "Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro". *J Gastroenterol Hepatol*. **7**: 165-72.
- Giuliano M., Lauricella M., Calvaruso G., Carabillo M., Emanuele S., Vento R. y Tesoriere G. (1999) "The apoptotic effects and synergistic interaction of sodium butyrate and MG132 in human retinoblastoma Y79 cells". *Cancer Res*. **59**: 5586-95.
- Goelz S.E., Vogelstein B., Hamilton S.R. y Feinberg A.P. (1985) "Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms". *Science*. **228**: 187-90.
- Gorospe M., Cirielli C., Wang X., Seth P., Capogrossi M.C. y Holbrook N.J. (1997) "p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells". *Oncogene* **14**: 929-35.
- Gorospe M., Wang X., Guyton K.Z. y Holbrook N.J. (1996) "Protective role of p21(Waf1/Cip1) against

- prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells". *Mol Cell Biol.* **16**: 6654-60.
- Green D.R.y Reed J.C. (1998) "Mitochondria and apoptosis". *Science* **281**: 1309-12.
- Green S.K., Frankel A.y Kerbel R.S.(1999) "Adhesion-dependent multicellular drug resistance". *Anticancer Drug Des.* **14**:153-68.
- Grover-McKay M., Walsh S.A., Seftor E.A., Thomas P.A.y Hendrix M.J. (1998) "Role for glucose transporter 1 protein in human breast cancer". *Pathol Oncol Res.* **4**: 115-20.
- Gulliver W.P., Kutty K.P., Laher J.M.y Barrowman J.A.(1983) "In vitro interaction of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and its biliary metabolites with dietary fiber". *J Natl Cancer Inst.* **71**: 207-10.
- Gupta R.A. y DuBois R.N. (2000) "Translational studies on Cox-2 inhibitors in the prevention and treatment of colon cancer". *Ann N Y Acad Sci.* **910**: 196-204 y 204-6.
- Haber R.S., Rathana A., Weiser K.R., Pritsker A., Itzkowitz S.H., Bodian C., Slater G., Weiss A.y Burstein D.E. (1998) "GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis". *Cancer* **83**: 34-40.
- Hague A., Elder D.J.E., Hicks D.J. y Pareskeva C. (1995), "Apoptosis in colorectal tumour cells: Induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate", *Int. J. Cancer* **60**: 400-406
- Hague A., Diaz G.D., Hicks D.J., Krajewski S., Reed J.C..y Paraskeva C. (1997) "bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis". *Int J Cancer* **72**: 898-905.
- Hanash S.M., Kuick R., Strahler, J.R., Richardson B., Reaman G., Stoolman L., Hanson C., Nichols D. y Tueche H.J. (1989) "Identification of a cellular polypeptide that distinguishes between acute lymphoblastic leukemia in infants and in older children". *Blood* **73**: 727-732.
- Hanauske A.R., Buchok J., Scheithauer W.y Von Hoff D.D. (1987) "Human colon cancer cell lines secrete alpha TGF-like activity". *Br J Cancer* **55**: 57-9.
- Hara A., Hibi T., Yoshioka M., Toda K., Watanabe N., Hayashi A., Iwao Y., Saito H., Watanabe T.y Tsuchiya M. (1993) "Changes of proliferative activity and phenotypes in spontaneous differentiation of a colon cancer cell line". *Jpn J Cancer Res.* **84**: 625-32.
- Harrison L.E., Wang Q.M., Studzinski G.P. (1999) "Butyrate-induced G2/M block in Caco-2 colon cancer cells is associated with decreased p34cdc2 activity". *Proc Soc Exp Biol Med.* **222**:150-6.
- Hasegawa S., Koshikawa N., Momiyama N., Moriyama K., Ichikawa Y., Ishikawa T., Mitsuhashi M., Shimada H.y Miyazaki K. (1998) "Matrilysin-specific antisense oligonucleotide inhibits liver metastasis of human colon cancer cells in a nude mouse model". *Int J Cancer* **76**: 812-6.
- Heerd T., B.G., Houston, M.A. y Augenlicht L.H. (1994), "Potentiation by short chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cells", *Cancer Res.* **54**: 3288-3294.
- Heerd B.G., Houston M.A., Anthony G.M.y Augenlicht L.H. (1998) "Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ (mt)) in the coordination of p53-independent proliferation and apoptosis pathways in human colonic carcinoma cells" *Cancer Res.* **58**: 2869-75.
- Heussen C. y Dowdle E.B. (1980) "Electroforetic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates" *Anal Biochem* **102**: 196-202.
- Ho S.B., Yan P.S., Dahiya R., Neuschwander-Tetri B.A., Basbaum C.y Kim Y.S. (1994) "Stable differentiation of a human colon adenocarcinoma cell line by sodium butyrate is associated with multidrug resistance". *J Cell Physiol.* **160**:213-26.
- Hodin R.A., Graham J.R., Meng S.y Upton M.P. (1994) "Temporal pattern of rat small intestinal gene expression with refeeding". *Am J Physiol* **266**: G83-9.
- Hodin R.A., Meng S., Archer S.y Tang R. (1996) "Cellular growth state differentially regulates enterocyte gene expression in butyrate-treated HT-29 cells". *Cell Growth Differ* **7**: 647-53.
- Honda T., Kai I. y Ohi G. (1999) "Fat and dietary fiber intake and colon cancer mortality: a chronological

- comparison between Japan and the United States". *Nutr Cancer* **33**: 95-9.
- Hsu P-L. y Hsu S-M. (1998) "Abundance of heat shock proteins (hsp89, hsp60, and hsp27) in malignant cell of Hodgkin's disease". *Cancer research* **58**: 5507-5513.
- Humphery-Smith I., Cordwell S.J. y Blackstock W.P. (1997) "Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds". *Electrophoresis* **18**: 1217-42.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) "A physical map of the human genome". *Nature* **409**: 934-41.
- Ito T., Noguchi Y., Satoh S., Hayashi H., Inayama Y. y Kitamura H. (1998) "Expression of facilitative glucose transporter isoforms in lung carcinomas: its relation to histologic type, differentiation grade, and tumor stage". *Mod Pathol.* **11**: 437-43.
- Janson W., Brandner G. y Siegel J. (1997) "Butyrate modulates DNA-damage-induced p53 response by induction of p53-independent differentiation and apoptosis". *Oncogene* **15**: 1395-406.
- Jass J.R. (1985) "Diet, butyric acid and differentiation of gastrointestinal tract tumours". *Med Hypotheses* **18**: 113-8.
- Ji H., Baldwin G.S., Burgess A.W., Moritz R.L., Ward L.D. y Simpson R.J. (1993) "Epidermal growth factor induces serine phosphorylation of stathmin in a human colon carcinoma cell line (LIM 1215)". *J Biol Chem.* **268**: 13396-405.
- Kamada S., Kusano H., Fujita H., Ohtsu M., Koya R.C., Kuzumaki N. y Tsujimoto Y. (1998) "A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin". *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8532-7.
- Kamada S., Washida M., Hasegawa J., Kusano H., Funahashi Y. y Tsujimoto Y. (1997) "Involvement of caspase-4(-like) protease in Fas-mediated apoptotic pathway". *Oncogene* **15**: 285-90.
- Kano A., Watanabe Y., Takeda N., Aizawa S. y Akaike T. (1997) "Analysis of IFN-gamma-induced cell cycle arrest and cell death in hepatocytes". *J Biochem (Tokyo)* **121**: 677-83.
- Kaur J., Srivastava A. y Ralhan R. (1998) "Expresión of 70-kDa heat shock protein in oral lesions: marker of biological stress or pathogenicity". *Oral Oncology*. **34**: 496-501.
- Kawamata H., Kameyama S., Kawai K., Tanaka Y., Nan L., Barch D.H., Stetler-Stevenson W.G. y Oyasu R. (1995) "Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A". *Int J Cancer* **63**: 568-575.
- Kawanishi K., Shiozaki H., Doki Y., Sakita I., Inoue M., Yano M., Tsujinaka T., Shamma A. y Monder M. (1999) "Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus". *Cancer* **85**: 1649-1657.
- Keesee S.K., Meneghini M.D., Szaro R.P. y Wu Y.J. (1994) "Nuclear matrix proteins in human colon cancer". *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 1913-6.
- Kido A., Tsutsumi M., Iki K., Takahama M., Tsujiuchi T., Morishita T., Tamai S., Konishi Y. (1999) "Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP)-9 correlates with metastatic potency of spontaneous and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO)-induced transplantable osteosarcomas in rats". *Cancer Lett.* **137**: 209-16.
- Kinzler K.W., Nilbert M.C., Vogelstein B., Bryan T.M., Levy D.B., Smith K.J., Preisinger A.C., Hamilton S.R., Hedge P., Markham A., et al. (1991) "Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers". *Science*. **251**: 1366-70.
- Kirlin W.G., Cai J., DeLong M.J., Patten E.J. y Jones D.P.. (1999) "Dietary compounds that induce cancer preventive phase 2 enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cells". *J Nutr.* **129**: 1827-35.
- Kitagawa T., Tsuruhara Y., Hayashi M., Endo T. y Stanbridge E.J. (1995) "A tumor-associated glycosylation change in the glucose transporter GLUT1 controlled by tumor suppressor function in human cell hybrids". *J Cell Sci.* **108**: 3735-43.

- Kitazono M., Sumizawa T., Takebayashi Y., Chen Z.S., Furukawa T., Nagayama S., Tani A., Takao S., Aikou T. y Akiyama S. (1999) "Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells". *J Natl Cancer Inst.* **91**:1647-53.
- Kleiner D.E.J. y Stetler-Stevenson W.G. (1993) "Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinase" *Curr Opin Cell Biol* **5**: 891-897.
- Krajewski S., Krajewska M., Turner B.C., Pratt C., Howard B., Zapata J.M., Frenkel V., Robertson S., Ikonov Y., Yamamoto H., Perucho M., Takayama S. y Reed J.C. (1999) "Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer". *Endocr Relat Cancer* **6**: 29-40.
- Krommenhoek W., Sebus J. y van Esch G.J. (1996) Atlas de Histología. Ed. Marban
- Krupitza G., Grill S., Harant H., Hulla W., Szekeres T., Huber H. y Dittrich C. (1996) "Genes related to growth and invasiveness are repressed by sodium butyrate in ovarian carcinoma cells". *Br J Cancer* **73**: 433-8.
- LaCasse E.C., Baird S., Korneluk R.G. y MacKenzie A.E. (1998) "The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer". *Oncogene* **17**: 3247-59.
- Laemmli U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature* **227**: 680-685.
- Landry J., Chrétien P., Laszlo A. y Lambert H. (1991) "Phosphorylation of hsp27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cell". *J. Cell. Physiol.* **147**: 93-101.
- Lazaris A.C., Chatzigianni E.B., Panoussopoulos D., Tzimas G.N., Davaris P.S. y Golematis B.C. (1997) "Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified". *Breast Cancer Res. Treat.* **43**: 43-51.
- Lazaris A.C., Theodoropoulos G.E., Davaris P.S., Panoussopoulos D., Nakopoulos L. y Kittas C. (1995) "Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression: prognostic implication in colorectal cancer". *Dis. Colon Rectum* **38**: 739-745.
- Lee Y.J., Galoforo S.S., Berns C.M., Tong W.P., Kim H.R. y Corry P.M. (1997) "Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death". *J Cell Sci.* **110**: 681-6.
- Lehnert L., Trost H., Schmiegell W., Roder C. y Kalthoff H. (1999) "Hollow-spheres: a new model for analyses of differentiation of pancreatic duct epithelial cells". *Ann N Y Acad Sci.* **880**: 83-93.
- Lehninger A.L., Nelson D.L. y Cox M.M. (1993) "Principios de Bioquímica". Ed. Omega
- Leibovitz A., Stinson J.C., McCombs W.B., McCoy C.E., Mazor K.C. y Mabry N.D. (1976) *Cancer Res* **36**: 4562-4569.
- Lesuffleur T., Barbat A., Dussaulx E. y Zweibaum A. (1990) "Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells". *Cancer Res.* **50**: 6334-43.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S. y Wang X. (1997) "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade". *Cell* **91**: 479-89.
- Li G.C. y Nussenzweig A. (1996) "Thermotolerance and heat shock proteins: Possible involvement of Ku autoantigen in regulating Hsp70 expression". En: *Stress-Inducible Cellular Response* (Feige U., Morimoto I.R., Yahara I. y Polla B. eds) pp.425-449, Birkhäuser Verlag.
- Lichtenstein A.H., Kennedy E., Barrier P., Danford D., Ernst N.D., Grundy S.M., Leveille G.A., Van Horn L., Williams C.L. y Booth S.L. (1998) "Dietary fat consumption and health". *Nutr Rev.* **56**: 3-28.
- Lindquist S. y Craig E. (1988) "The heat shock proteins". *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677.
- Litvak D.A., Evers B.M., Hwang K.O., Hellmich M.R., Ko T.C. y Townsend C.M. Jr. (1998) "Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1". *Surgery* **124**:161-9; discussion 169-70.
- Livesey G. (1990) "Energy values of unavailable carbohydrate and diets: an inquiry and analysis". *Am J Clin*

- Nutr.* 51: 617-37.
- López de Silanes I. (1997). "Implicación de metaloproteinasas de la matriz en la adquisición de un fenotipo metastático en células BCS-TC2 de adenocarcinoma de colon". Tesina de licenciatura. U. Complutense de Madrid, Fac. CC. Químicas.
- López-Conejo M.T., Turnay J., Olmo N., Navarro J.M. y Lizarbe M.A. (1995) "Effect of Matrigel on the tumorigenic potencial of BCS-TC2 cells (human colon adenocarcinoma)". *Oncology Reports* 2: 952.
- López-Conejo M.T., Olmo N., Turnay J., Navarro J.M. y Lizarbe M.A. (1996) "Characterization of tumorigenic sub-lines from a poorly tumorigenic human colon-adenocarcinoma cell line" *Int J Cancer* 67:668-675.
- Lupton J.R. (1995) "Butyrate and colonic cytokinetics: differences between in vitro and in vivo studies". *Eur J Cancer Prev.* 4: 373-8.
- Lynch H.T., Fusaro R.M. y Lynch J.F. (1997) "Cancer genetics in the new era of molecular biology". *Ann N Y Acad Sci.* 833: 1-28.
- MacDougall J.R. y Matrisian L.M. (1995) "Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis" *Cancer Met Rev* 14:351-362.
- Maiga H.A., Schingoethe D.J. y Ludens F.C. (1995) "Evaluation of diets containing supplemental fat with different sources of carbohydrates for lactating dairy cows". *J Dairy Sci.* 78: 1122-30.
- Mandal M. y Kumar R. (1996) "Bcl-2 expression regulates sodium butyrate-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells". *Cell Growth Differ.* 7: 311-8.
- Mangurten A.B., Brader K.R., Loos B.M., Lee E., Quiroga A.I., Bathori J., Lurain J.R., Laszlo A. y Phillips B. (1997) "Hsp70 and Hsc70 are preferentially expressed in differentiated epithelial cells in normal human endometrium and ectocervix". *Cell Stress and Chaperones* 2: 168-174.
- Mari B.P., Anderson I.C., Mari S.E., Ning Y., Lutz Y., Kobzik L. y Shipp M.A. (1998) "Stromelysin-3 is induced in tumor/stroma cocultures and inactivated via a tumor-specific and basic fibroblast growth factor-dependent mechanism". *J Biol Chem.* 273: 618-26.
- Mariadason J.M., Rickard K.L., Barkla D.H., Augenlicht L.H. y Gibson P.R. (2000) "Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation". *J Cell Physiol* 183: 347-54.
- Marks D.C., Davey M.W., Davey R.A. y Kidman A.D. (1995) "Expression of multidrug resistance in response to differentiation in the K562 human leukaemia cell line". *Biochem Pharmacol.* 50: 475-80.
- Masson R., Lefebvre O., Noel A., Fahime M.E., Chenard M.P., Wendling C., Kebers F., Le Meur M., Dierich A., Foidart J.M., Basset P., Rio M.C. (1998) "In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy". *J Cell Biol* 140: 1535-41.
- Mathur S.K., Sistonen L., Brown I.R., Murphy S.P., Sarge K.D. y Morimoto R.I. (1994) "Deficient induction of hman hsp70 heat shock gene transcription in Y79 retinoblastoma cells despite activation of heat shock factor 1". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8695-8699.
- McCawley L.J. y Matrisian L.M. (2000) "Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression". *Mol Med Today* 6:149-56.
- McDonnell S., Navre M., Coffey R.J. y Matrisian L.M. (1991) "Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas" *Mol Carcinogenesis* 4:527-533
- McDonnell S., Navre M., Coffey R.J. y Matrisian L.M. (1991) "Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas" *Mol Carcinogenesis* 4: 527-533.
- McIntyre A., Gibson P.R. y Young G.P. (1993) "Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model". *Gut* 34: 386-91.
- McMillan D.R., Xiao X., Shao L., Graves K. y Benjamin I.J. (1998) "Targeted disruption of heat transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis". *J. Biol. Chem.* 273: 7523-7528.

- Medema J.P., Scaffidi C., Kischkel F.C., Shevchenko A., Mann M., Krammer P.H. y Peter M.E. (1997) "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)". *EMBO J.* **16**: 2794-804.
- Medina V, Edmonds B., Young G.P., James R., Appleton S. y Zalewski P.D. (1997) "Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway". *Cancer Res.* **57**: 3697-707.
- Melchiori A., Albin A., Ray J.M. y Stetler-Stevenson W.G. (1992) "Inhibition of tumor cell invasion by a highly conserved peptide sequence from the matrix metalloproteinase enzyme prosegment" *Cancer Res* **52**:2353-2356.
- Melis R. y White R. (1999) "Characterization of colonic polyps by two-dimensional gel electrophoresis". *Electrophoresis* **20**: 1055-1064.
- Milarski K.L. y Morimoto R.I. (1986) "Expression of human hsp 70 during the synthetic phase of the cell cycle". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9517-9521.
- Minowa T., Ohtsuka S., Sasai H. y Kamada M. (2000) "Proteomic analysis of the small intestine and colon epithelia of adenomatous polyposis coli gene-mutant mice by two-dimensional gel electrophoresis". *Electrophoresis* **21**: 1782-6.
- Mivechi N.F., Park Y.M., Ouyang H., Shi X.Y. y Hahn G.M. (1994) "Selective expression of heat shock genes during differentiation of human myeloid leukemic cells". *Leuk Res.* **18**: 597-608.
- Mivechi N.F. y Rossi J.J. (1990) "Use of polymerase chain reaction to detect the expression of the M_r-70,000 heat-shock genes in control or heat-shock leukemic cells as correlated to their heat response". *Cancer Res.* **50**: 2877-2884.
- Mivechi N.F., Park Y.M., Ouyang H., Shi X.Y., Hahn G.M. (1999) "Selective expression of heat shock genes during differentiation of human myeloid leukemic cells". *Leuk Res.* **18**: 597-608.
- Morimoto, R.I. y Milarski, K.L. (1990) "Expression and function of vertebrate hsp70 genes". En: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* En: *The Biology of heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C., eds) pp. 1-23, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Morino M., Tsuzuki T., Ishikawa Y., Shirakami T., Yoshimura M., Kiyosue Y-I., Tsunaga K., Yoshikumi C. y Saijo N. (1997) "Specific expression of HSP27 in human tumor cell lines in vitro". *In vivo* **11**: 179-184.
- Motyl T. (1999) "Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2-related proteins". *Reprod Nutr Dev.* **39**: 49-59.
- Mueller J., Mueller E., Arras E., Bethke B., Stolte M. y Hofler H. (1997) "Stromelysin-3 expression in early (pT1) carcinomas and pseudoinvasive lesions of the colorectum". *Virchows Arch.* **430**: 213-9.
- Muñoz A. (1997) "Cáncer. Genes y nuevas terapias". Editorial Hélice
- Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E. y Dixit V.M. (1996) "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex". *Cell* **85**: 817-27.
- Nagase H. (1997) "Activation mechanisms of matrix metalloproteinases". *Biol Chem* **378**: 151-60.
- Nakano K., Mizuno T., Sowa Y., Orita T., Yoshino T., Okuyama Y., Fujita T., Ohtani-Fujita N., Matsukawa Y., Tokino T., Yamagishi H., Oka T., Nomura H. y Sakai T. (1997) "Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line". *J Biol Chem.* **272**: 22199-206.
- Navarro M. (1996) "Aislamiento y caracterización de 5'-nucleotidasa de células BCS-TC2 (adenocarcinoma de colon humano). Estudios de diferenciación". Tesis doctoral, U. Complutense de Madrid, Fac. CC. Químicas
- Navarro J.M., Olmo N, Turnay J., Lopez-Conejo M.T., Lizarbe M.A. (1997) "Differentiation of BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells by sodium butyrate: increase in 5'-nucleotidase activity". *Eur J Clin Invest.* **27**: 620-8.

- Newmark H.L., Lupton J.R. y Young C.W. (1994) "Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status". *Cancer Lett.* **78**: 1-5.
- Nielsen B.S., Timshel S., Kjeldsen L., Sehested M., Pyke C., Borregaard N. y Dano K. (1996) "92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer" *Int J Cancer* **65**: 57-62.
- Noël A.C., Lefebvre O., Maquoi E., VanHoorde L., Chenard M.P., Mareel M., Foidart J.M., Basset P y Rio M.C (1996) "Stromelysin-3 expression promotes tumor take in nude mice" *J Clin Invest* **97**:1924-1930.
- Noguchi P., Wallace R., Johnson J., Earley E.M., O'Brien S., Ferrone S., Pellegrino M.A., Milstien J., Needy C., Browne W., Petricciani J. (1979) "Characterization of the WIDR: a human colon carcinoma cell line". *In Vitro* **15**: 401-8.
- Noguchi Y., Sato S., Marat D., Doi C., Yoshikawa T., Saito A., Ito T., Tsuburaya A. y Yanuma S. (1999a) "Glucose uptake in the human gastric cancer cell line, MKN 28, is increased by insulin stimulation". *Cancer Lett.* **140**: 69-74.
- O'Farrell P.H. (1975) "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins" *J Biol Chem* **250**: 4007-4021.
- O'Farrell P.Z., Goodman H.M. y O'Farrell P.H. (1977) "High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins". *Cell* **12**: 1133-41.
- Oesterreich S., Weng, C.N., Qiu M., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K. y Fuqua, S.A. (1993) "The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines". *Cancer Res.* **53**: 4443-4448.
- Ohashi K, Nemoto T., Nakamura K y Nemori R. (2000) "Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas". *Cancer* **88**: 2201-9.
- Okada A., Bellocq J., Chenard M., Rio M., Chambon P. y Basset P. (1995) "Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast and head and neck carcinomas" *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:2730-2734.
- Parodi P.W.. (1997) "Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents". *J Nutr.* **127**: 1055-60.
- Parzell D.A., y Lindquist S. (1994) "Heat shock protein and stress tolerance." En: *The Biology of heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R.I., Tissières, A., Georgopoulos, C., eds) pp. 457-493, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Parsons S.L., Watson S.A., Collins H.M., Griffin N.R., Clarke P.A. y Steele R.J. (1998) "Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy". *Br J Cancer* **78**: 1495-502.
- Pei D. y Weiss S.J. (1995) "Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen" *Nature* **375**: 244-247.
- Pender S.L, Quinn J.J., Sanderson I.R. y MacDonald T.T. (2000) "Butyrate upregulates stromelysin-1 production by intestinal mesenchymal cells". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **279**: G918-24.
- Perucho M. (1996) "Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator" *Nat Med* **2**: 630-631.
- Peterson M.D. y Mooseker M.S. (1993), "An *in vitro* model for the analysis of intestinal brush border assembly. Ultrastructural analysis of cell contact-induced brush border assembly in Caco-2", *J. Cell Sci.* **105**: 445-472.
- Petronini P.G., Urbani S., Alfieri R., Borghetti A.F. y Guidotti G.G. (1996) "Cell susceptibility to apoptosis by glutamine deprivation and rescue: survival and apoptotic death in cultured lymphoma-leukemia cell lines". *J Cell Physiol.* **169**: 175-85.
- Pool-Zobel B.L., Bub A., Muller H., Wollowski I. y Rechkemmer G. (1997) "Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods". *Carcinogenesis* **18**: 1847-50.
- Pouillart PR. (1998) "Role of butyric acid and its derivatives in the treatment of colorectal cancer and

- hemoglobinopathies". *Life Sci.* **63**: 1739-60.
- Prasad K.N. (1980) "Butyric acid: a small fatty acid with diverse biological functions". *Life Sci.* **27**: 1351-8.
- Reed J.C. (1995) "Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance". *Curr Opin Oncol.* **7**: 541-6.
- Reid G.E., Ji H., Eddes J.S., Moritz R.L. y Simpson R.J. (1995) "Nonreducing two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic analysis of human colonic proteins". *Electrophoresis* **16**: 1120-30.
- Rickard K.L., Gibson P.R., Young G.P. y Phillips W.A. (1999) "Activation of protein kinase C augments butyrate-induced differentiation and turnover in human colonic epithelial cells in vitro". *Carcinogenesis* **20**: 977-84.
- Rodriguez J., Agudo M., Van Damme J., Vandekerckhove J. y Santaren J.F. (2000) "Polypeptides differentially expressed in imaginal discs define the peroxiredoxin family of genes in *Drosophila*". *Eur J Biochem.* **267**: 487-97.
- Rouyer N, Wolf C., Chenard M.P., Rio M.C., Chambon P., Bellocq J.P y Basset P. (1994-95) "Stromelysin-3 gene expression in human cancer: an overview". *Invasion Metastasis*. **14**: 269-75.
- Ruemmele F.M., Dionne S., Qureshi I., Sarma D.S., Levy E. y Seidman E.G. (1999) "Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP)". *Cell Death Differ.* **6**: 729-35.
- Sacchi, C.M. y Schiaffonati, L. (1996) "The effect of etoposide (VP-16) on mouse L fibroblasts: Modulation of stress response, growth and apoptosis genes". *Anticancer Res.* **16**: 3659-3664.
- Saito H., Ebinuma H., Takahashi M., Kaneko F., Wakabayashi K., Nakamura M. y Ishii H. (1998) "Loss of butyrate-induced apoptosis in human hepatoma cell lines HCC-M and HCC-T having substantial Bcl-2 expression". *Hepatology* **27**: 1233-40.
- Saito H., Ebinuma H., Takahashi M., Kaneko F., Wakabayashi K., Nakamura M. y Ishii H. (1998) "Loss of butyrate-induced apoptosis in human hepatoma cell lines HCC-M and HCC-T having substantial Bcl-2 expression". *Hepatology* **27**: 1233-40.
- Santarén J.F. y García-Bellido A. (1996) "2D gene expression parameters of wing imaginal disc of *Drosophila* for developmental analysis" *Dev Genes Evol* **206**: 349-354.
- Santarosa M., Favaro D., Quai M. y Galligioni E. (1997) "Expresión of heat shock protein 72 in rectal cell carcinoma: posible role and prognostic implications in cancer patients". *Eur. J. Cancer* **33**: 873-877.
- Santini M.T, Rainaldi G. y Indovina P.L. (1999) "Multicellular tumour spheroids in radiation biology". *Int J Radiat* **75**: 787-99.
- Santini M.T. y Rainaldi G. (1999) "Three-dimensional spheroid model in tumor biology". *Pathobiology* **67**: 148-57.
- Schiaffonati L., Pappalardo C. y Tacchini L. (1991) "Expresión of the hsp70 gene family in rat hepatoma cell lines of different growth rates". *Cell Res.* **196**: 330-336.
- Schroy P., Rustgi A.K., Ikonomu E., Liu X.P., Polito J., Andry C. y O'Keanne J.C. (1994), "Growth and intestinal differentiation are independently regulated in HT29 colon cancer cells", *J. of Cell Physiol.* **161**: 111-123
- Schwartz B., Avivi-Green C. y Polak-Charcon S. (1998) "Sodium butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells". *Mol Cell Biochem.* **188**: 21-30.
- Sehested J., Diemaes L., Moller P.D. y Skadhauge E. (1999) "Transport of butyrate across the isolated bovine rumen epithelium--interaction with sodium, chloride and bicarbonate". *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **123**: 399-408.
- Senekowitsch-Schmidtke R. (1999) "Binding of EGF peptide and EGF receptor antibodies and its fragments in different tumor models". *Hybridoma* **18**: 29-35.
- Shack S., Miller A., Liu L., Prasanna P., Thibault A. y Samid D. (1996) "Vulnerability of multidrug-resistant tumor cells to the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate". *Clin Cancer Res.* **2**: 865-72.

- Shanmugathasan M. y Jothy S. Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer. *Pathol Int.* 2000 Apr;50(4):273-9.
- Sheikh M.S., Chen Y.Q, Smith M.L.y Fornace A.J. Jr. (1997) "Role of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in cell death and DNA repair as studied using a tetracycline-inducible system in p53-deficient cells". *Oncogene* **14**: 1875-82.
- Shim H., Chun Y.S., Lewis B.C.y Dang C.V. (1998) "A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc". *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1511-6.
- Siavoshian S., Segain J.P., Kornprobst M., Bonnet C., Cherbut C., Galmiche J.P.y Blottiere H.M. (2000) "Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression". *Gut* **46**: 507-14.
- Singh B., Halestrap A.P.y Paraskeva C. (1997) "Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources". *Carcinogenesis* **18**: 1265-70.
- Skowrya D., Georgopoulos C. y Zylicz M. (1990) "The E. coli dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner." *Cell* **63**: 325-331.
- Smith T.A. (1999) "Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue". *Br J Biomed Sci.* **56**: 285-92.
- Smith C.A., Williams G.T., Kingston R., Jenkinson E.J. y Owen J.J.T. (1989), "Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures", *Nature* **337**: 181-184
- Smith-Barbaro P., Hanson D.y Reddy B.S.(1981) "Carcinogen binding to various types of dietary fiber". *J Natl Cancer Inst.* **67**: 495-7.
- Somasundaram K. y El-Deiry W.S. (2000) "Tumor supressor p53: regulation and function" *Frontiers in Bioscience* **5**: 424-437.
- Soranzo C., Della Torre G. y Ingrosso A. (1986) "Formation, growth and morphology of multicellular tumor spheroids from a human colon carcinoma cell line (LoVo)". *Tumori* **72**: 459-467.
- Springman E.B., Angleton E.L.y Birkedal-Hansen H. *et al.* (1990) "Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase" *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:364-368.
- Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T.y Alnemri E.S. (1998) "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization". *Mol Cell.* **1**: 949-57.
- Srinivasula S.M., Fernandes-Alnemri T., Zangrilli J., Robertson N., Armstrong R.C., Wang L, Trapani J.A., Tomaselli K.J., Litwack G.y Alnemri E.S. (1996b) "The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32". *J Biol Chem.* **271**: 27099-106.
- Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Litwack G.y Alnemri E.S. (1996a) "Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases". *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14486-91.
- Stetler-Stevenson W.G., Aznavoorian S y Liotta L.A. (1993) "Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis" *Annu Rev Cell Biol* **9**: 541-573.
- Stetler-Stevenson W.G., Krutzsch H.C., Wachter M.P., Margulier I.M.K. y Liotta L.A. (1989) "Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family" *J Biol Chem* **264**:1353-1356.
- Strahler, J.R., Kuick R., Eckerskorn C., Lottspeich, F., Richardson, B.C., Fox, D.A., Stoolman, L.M., Hanson C.A., Nichols D. y Tueche H.J. (1990) "Identification of two related markers of common acute lymphoblastic leukemia as heat shock proteins". *J. Clin. Invest.* **85**: 200-207.
- Stulik J., Koupilova K., Osterreicher J., Knizek J., Macela A., Bures J., Jandik P., Langr F., Dedic K., Jungblut P.R. (1999) "Protein abundance alterations in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma". *Electrophoresis* **20**: 3638-46.
- Stulik J., Koupilova K., Osterreicher J., Knizek J., Macela A., Bures J., Jandik P., Langr F., Dedic K. y Jungblut

- P.R. (1999) "Protein abundance alterations in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma". *Electrophoresis* **20**: 3638-46.
- Stürzbecher H.W., Addison C. y Jenkins, J.R. (1988) "Characterization of mutant p53-hsp72/73 protein-protein complexes by transient expression in monkey COS cells". *Mol. Cell Biol.* **8**: 3740-3747.
- Su L.K., Vogelstein B. y Kinzler K.W. (1993) "Association of the APC tumor suppressor protein with catenins". *Science*. **262**: 1734-7.
- Summerhayes I.C., Lampidis T.J., Bernal S.D., Nadakavukaren J.J., Nadakavukaren K.K, Shepherd E.L, Chen L.B. (1982) "Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **79**:5292-6.
- Sutherland R., Freyer J., Mueller-Kheiler W., Wilson R., Heacock C., Sciandra J. y Sordat B. (1986) "Cellular growth and metabolic adaptations to nutrient stress environments in tumor microregions" *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **12**: 611-615.
- Sutherland R.M., Carlsson J., Durand R. y Juhas J. (1981) "Spheroids in cancer research". *Cancer Res.* **41**: 2980-2994.
- Sutherland R.M. y Durand R. (1984) "Growth and cellular characteristics of multicellular spheroids". *Recent Results Cancer Res.* **95**: 24-49.
- Suzuki H., Tomida A. y Tsuruo T. (1998) "A novel mutant from apoptosis-resistant colon cancer HT-29 cells showing hyper-apoptotic response to hypoxia, low glucose and cisplatin". *Jpn J Cancer Res.* **89**: 1169-78.
- Takahashi S., Mikami T., Watanabe Y., Okazaki A., Sato T., Asaishi K., Hirata K., Narimatsu E., Mori M., Sato N. y Kikuchi K. (1994) "Correlation of heat shock protein 70 expression with estrogen receptor levels in invasive human breast cancer". *Am. J. Clin. Pathol.* **101**: 519
- Takahashi A., Alnemri E.S., Lazebnik Y.A., Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Moir R.D., Goldman R.D., Poirier G.G., Kaufmann S.H. y Eamshaw W.C. (1996) "Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 8395-400.
- Takaku K., Oshima M., Miyoshi H., Matsui M., Seldin M.F. y Taketo M.M. (1998) "Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell*. **92**: 645-56.
- Takano M., Rhoads D.B. y Isselbacher K.J. (1988) "Sodium butyrate increases glucose transporter expression in LLC-PK1 cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8072-5.
- Takasu M., Tada Y., Wang J.O., Tagawa M. y Takenaga K. (1999) "Resistance to apoptosis induced by microenvironmental stresses is correlated with metastatic potential in Lewis lung carcinoma". *Clin Exp Metastasis* **17**: 409-16.
- Tanaka K., Iwamoto S., Gon G., Nohara T., Iwamoto M. y Tanigawa N. (2000) "Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas". *Clin Cancer Res.* **6**: 127-34.
- Tetu B., Brisson J., Lapointe H. y Bernard P. (1998) "Prognostic significance of stromelysin 3, gelatinase A., and urokinase expression in breast cancer". *Hum Pathol.* **29**: 979-85.
- Têtu B., Lacasser B., Bouchard H-L., Lacacé R., Huot J. y Landry J. (1992) "Prognostic influence of HSP27 expression in malignant fibrous histiocytoma: a clinicopathological and immunohistochemical study". *Cancer Res.* **52**: 2325-2328.
- Tey B.T., Singh R.P., Piredda L., Piacentini M. y Al-Rubeai M. (2000) "Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NS0 cultures". *J Biotechnol.* **79**: 147-59.
- Thewes M., Pohlmann G., Atkinson M., Mueller J., Putz B. y Hofler H. (1996) "Stromelysin-3 (ST-3) mRNA expression in colorectal carcinomas. Localization and clinicopathologic correlations". *Diagn Mol Pathol* **5**: 284-90.
- Thewes M., Worret W.I., Engst R. y Ring J. (1999) "Stromelysin-3 (ST-3): immunohistochemical characterization of the matrix metalloproteinase (MMP)-11 in benign and malignant skin tumours and other skin disorders". *Clin Exp Dermatol.* **24**: 122-6.
- Thomas D.B. y Karagas M.R. (1987) "Cancer in first and second generation Americans". *Cancer Res.* **47**: 5771-6.

- Thompson H.J., Jiang W. y Zhu Z. (1999) "Mechanisms by which energy restriction inhibits carcinogenesis". *Adv Exp Med Biol* **470**: 77-84.
- Thor A., Benz C., Moore D., Goldman E., Edgerton S., Landry J., Schwartz L., Mayal B., Hickey E. y Weber L.A. (1991) "Stress response protein (srp-27) determination in primary human breast carcinomas: clinico-histologic correlations and prognostic significance". *J. Natl. Cancer Inst.* **83**: 170-178.
- Tomasovic S.P y Welch D.R. (1986) "Heat stress proteins and experimental cancer metastasis" *Int. J. Hyperth.* **2**: 253-266.
- Tonelli F., Dolara P., Batignani G., Monaci I., Caderni G., Spagnesi M.T., Luceri C. y Amorosi A. (1995) "Effects of short chain fatty acids on mucosal proliferation and inflammation of ileal pouches in patients with ulcerative colitis and familial polyposis". *Dis Colon Rectum* **38**: 974-8.
- Towbin H., Staehelin T. y Gordon J. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications" *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354
- Tsuji M., DuBois R.N. (1995) "Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2". *Cell* **83**: 493-501.
- Turnay J., Olmo N., Gavilanes J.G., Benitez J. y Lizarbe M.A. (1990) "Establishment and characterization of a new human colon adenocarcinoma cell line: BCS-TC2" *Cytotechnology* **3**: 75-88.
- Turnay F.J. (1989) Tesis doctoral, U. Complutense de Madrid, Fac. CC. Químicas.
- Undén A.B., Sandstedt B., Bruce K., Hedblad M.A. y Stahle-Bäckdahl M. (1996) "Stromelysin-3 mRNA associated with myofibroblasts is overexpressed in aggressive basal cell carcinoma and in dermatofibroma but not in dermatofibrosarcoma" *J Invest Dermatol* **107**: 147-153.
- Vayssiere J.L., Petit P.X., Risler Y. y Mignotte B. (1994) "Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40". *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11752-6.
- Vinals F., Fandos C., Santalucia T., Ferre J., Testar X., Palacin M. y Zorzano A. (1997) "Myogenesis and MyoD down-regulate Sp1. A mechanism for the repression of GLUT1 during muscle cell differentiation". *J Biol Chem.* **272**: 12913-21.
- Vogelstein B., Fearon E.R., Kern S.E., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Nakamura Y. y White R. (1989) "Allelotype of colorectal carcinomas". *Science*. **244**: 207-11.
- von Engelhardt W., Bartels J., Kirschberger S., Meyer zu Düttingdorf H.D. y Busche R. (1998) "Role of short-chain fatty acids in the hind gut". *Vet Q.* **20**: S52-9.
- von Marschall Z., Riecken E.O. y Rosewicz S. (1998) "Stromelysin 3 is overexpressed in human pancreatic carcinoma and regulated by retinoic acid in pancreatic carcinoma cell lines". *Gut* **43**: 692-8.
- Wakabayashi K., Saito H., Ebinuma H., Saito Y., Takagi T., Nakamura M., Umezawa A., Hata J. y Ishii H. (2000). "Bcl-2 related proteins are dramatically induced at the early stage of differentiation in human liver cancer cells by a histone deacetylase inhibitor projecting an anti-apoptotic role during this period" *Oncol Rep.* **7**: 285-8.
- Waki A., Fujibayashi Y. y Yokoyama A. (1998) "Recent advances in the analyses of the characteristics of tumors on FDG uptake". *Nucl Med Biol.* **25**: 589-92.
- Walker P.S., Donovan J.A., Van Ness B.G., Fellows R.E. y Pessin J.E. (1998) "Glucose-dependent regulation of glucose transport activity, protein, and mRNA in primary cultures of rat brain glial cells". *J Biol Chem.* **263**: 15594-601.
- Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A., Yan J.X., Gooley A.A., Wilkins M.R., Duncan M.W., Harris R., Williams K.L. y Humphery-Smith I. (1995) "Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*". *Electrophoresis* **16**: 1090-4.
- Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A., Yan J.X., Gooley A.A., Wilkins M.R., Duncan M.W., Harris R., Williams K.L. y Humphery-Smith I. (1995) "Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*". *Electrophoresis* **16**: 1090-4.

- Welch, W.J. (1985) "Phorbol ester, calcium ionophore, or serum added to quiescent rat embryo fibroblast cell all result in the elevated phosphorylation of two 28,000-dalton mammalian stress protein". *J. Biol. Chem.* **260**: 3058-3062.
- Wertheimer E., Sasson S., Cerasi E. y Ben-Neriah Y. (1991) "The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins". *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2525-9.
- Whitlock J.P., Galeazzi D. y Schulman H. (1983) "Acetylation and calcium-dependent phosphorylation of histone H3 in nuclei from butyrate-treated HeLa cells". *J Biol Chem.* **258**: 1299-304.
- Williams A.C., Harper S.J. y Paraskeva C. (1990) "Neoplastic transformation of a human colonic epithelial cell line: in vitro evidence for the adenoma to carcinoma sequence". *Cancer Res.* **50**: 4724-30.
- Wolf C., Rouyer N., Lutz Y., Adida C., Lorient M., Bellocq J.P., Chambon P. y Basset P. (1993) "Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression". *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1843-1847.
- Wu Y.D. y Song J.D. (2000) "The expression of glucose regulated protein-94 in colorectal carcinoma cells treated by sodium butyrate". *Cell Res.* **10**: 115-25.
- Wyllie A.H., Kerr J.F.R. y Currie A.R. (1980), "Cell death: the significance of apoptosis", *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.
- Wynder E.L., Cohen L.A., Muscat J.E., Winters B., Dwyer J.T. y Blackburn G. (1997) "Breast cancer: weighing the evidence for a promoting role of dietary fat". *J Natl Cancer Inst.* **89**: 766-75.
- Yamamoto H., Fujimoto J., Okamoto E., Furuyama J., Tamaoki T. y Hashimoto-Tamaoki T. (1998) "Suppression of growth of hepatocellular carcinoma by sodium butyrate in vitro and in vivo". *Int J Cancer* **76**: 897-902.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.I., Jones D.P. y Wang X. (1997) "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked". *Science* **275**: 1129-32.
- Yehiely F. y Oren M. (1992) "The gene for the rat heat-shock cognate, hsc70, can suppress oncogene-mediated transformation". *Cell Growth Differ.* **3**: 803-809.
- Yen A., Varvayanis S. (1995) "RB phosphorylation in sodium butyrate-resistant HL-60 cells: cross-resistance to retinoic acid but not vitamin D3". *J Cell Physiol* **163**: 502-9.
- Yokomori N., Tawata M. y Onaya T. (1999) "A transcriptional repressor regulates mouse GLUT4 gene expression during the differentiation of 3T3-L1 cells". *Diabetes* **48**: 2471-4.
- Yoshida M., Kijima M., Akita M. y Beppu T. (1990) "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin". *A.J Biol Chem.* **265**: 17174-9.
- Younes M., Lechago L.V. y Lechago J. (1996) "Overexpression of the human erythrocyte glucose transporter occurs as a late event in human colorectal carcinogenesis and is associated with an increased incidence of lymph node metastases". *Clin Cancer Res.* **2**: 1151-4.
- Younes M., Brown R.W., Stephenson M., Gondo M. y Cagle P.T. (1997) "Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I non-small cell lung carcinoma is associated with poor survival". *Cancer* **80**: 1046-51.
- Young G.P. y Gibson P.R. (1994) "Butyrate and the colorectal cancer cell" (En: Short Chain Fatty Acids; Binder J.H., Cummings J. y Soergel K., eds) pp 148-160. Kluwer, London, U.K.
- Yuhas J.M., Li A.P., Martínez A.O. y Ladman A.J. (1977) "A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids". *Cancer Res.* **37**: 3639-3643.
- Zhang M., Buckley D.J., Lavoie K.P., Buckley A.R. y Blake, M.J. (1998) "Heat-induced proteolysis of HSF causes premature deactivation of the heat shock response in Nb2 lymphoma cells". *Cell Stress and Chaperones* **3**: 57-66.
- Zhang Y., Center D.M., Wu D.M., Cruikshank W.W., Yuan J., Andrews D.W. y Kornfeld H. (1998) "Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3". *J Biol Chem.* **273**: 1144-9.